

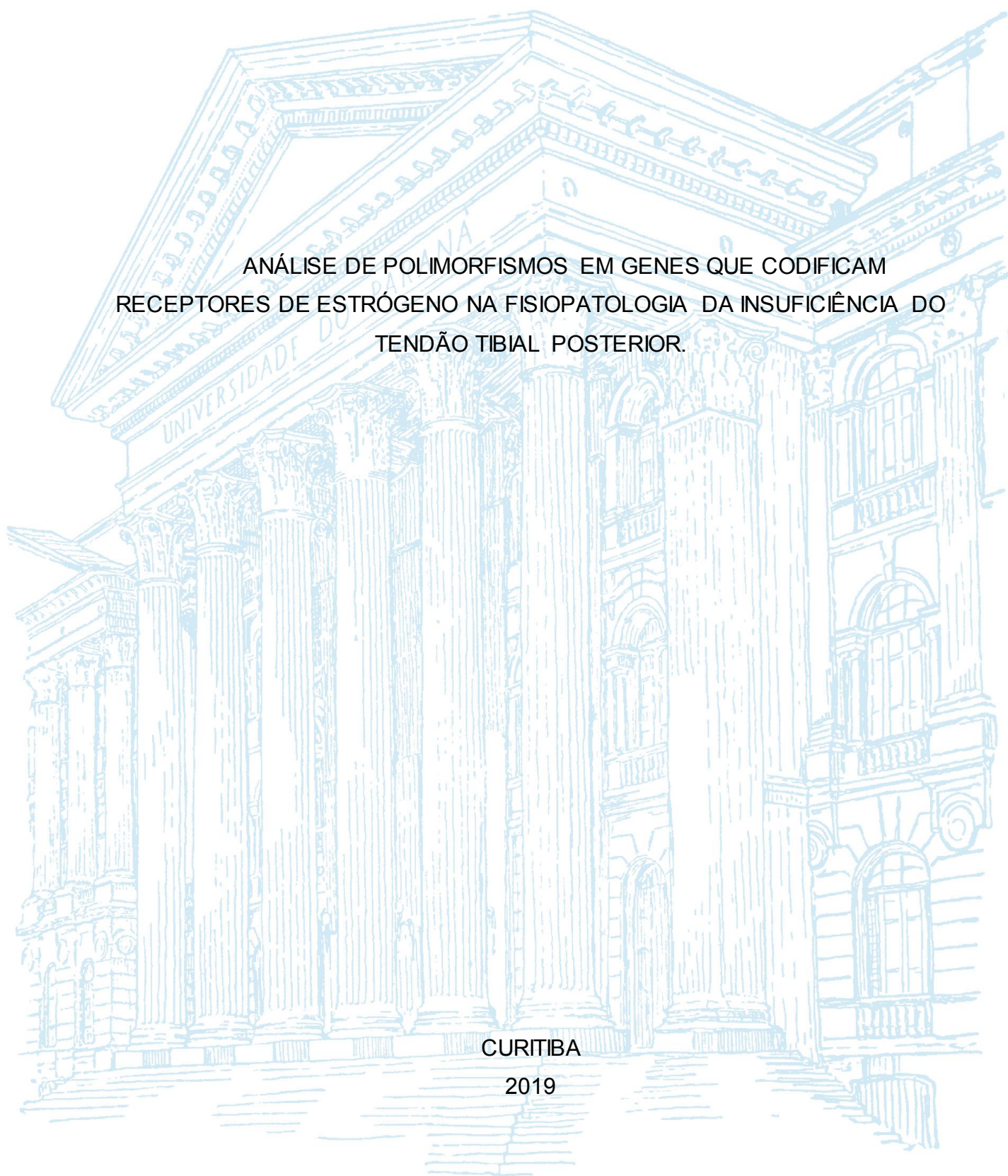
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA REGINA BACH NOGARA

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM
RECEPTORES DE ESTRÓGENO NA FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA DO
TENDÃO TIBIAL POSTERIOR.

CURITIBA

2019



PAULA REGINA BACH NOGARA

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM
RECEPTORES DE ESTRÓGENO NA FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA DO
TENDÃO TIBIAL POSTERIOR.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Professora Dra. Maria Cristina Leme
Godoy dos Santos

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Nogara, Paula Regina Bach

Análise de polimorfismos em genes que codificam receptores de
estrógeno na fisiopatologia da insuficiência do tendão tibial posterior. / Paula
Regina Bach Nogara. – Curitiba, 2019.

77 f. : il.

Orientadora: Maria Cristina Leme Godoy dos Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Tendinopatia. 2. Estrógenos. 3. Polimorfismo (Genética). 4.
Fisiopatologia. 5. Tendões. 6. Tíbia. I. Título. II. Santos, Maria Cristina Leme
Godoy dos. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.75



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PAULA REGINA BACH NOGARA** intitulada: **ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM RECEPTORES DE ESTRÓGENO NA FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2019.

CLEBER MACHADO DE SOUZA
Avaliador Externo (PUC-PR)

ADRIANA FRÖHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (UFPR)

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS
Presidente da Banca Examinadora

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA
Avaliador Externo (DPTO. GENET)

RUBENS BERTAZZOLI FILHO
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos, pelo apoio e compreensão, dos momentos de ausência durante a execução do mesmo.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado contou com diferentes apoios e incentivos sem os quais não teria se tornado uma realidade e aos quais serei eternamente grata.

Agradeço imensamente ao apoio da minha orientadora, Dra. Maria Cristina, a qual conheci através de uma troca de e-mails que enviei pedindo se a mesma gostaria de me orientar no doutorado. Fomos nos conhecendo melhor ao longo do doutorado e encontrei uma querida amiga e excelente profissional. Pessoas como ela, quando cruzam nosso caminho, fazem essa trajetória mais feliz. Meu muito obrigada!

Aos meus familiares, em primeiro lugar meu esposo Enio Nogara. Sei que não foram momentos fáceis, que estivemos longe por longos períodos, mas o esforço valeu a pena. Obrigado por me apoiar e me incentivar, principalmente nos momentos em que pensava em desistir! Aos meus filhos, Maísa e Vicente, este que chegou de surpresa no final do doutorado, alegrando ainda mais nossa família, amo vocês. Aos meus pais, irmãs, cunhados e aos meus sogros, sem vocês eu não teria dado conta.

A minha querida amiga Francielle Boçon, grata amizade que o doutorado me trouxe. Tenho muito a agradecer-lá pelos momentos de conversa e confraternização, juntamente com as meninas da genética e também agradecer pela disponibilidade e ajuda com as “coisas” do laboratório. Agradeço também aos colegas de doutorado, especialmente ao pessoal do laboratório do professor Dr. Silvio Sanches Veiga.

Ao grupo de pesquisa parceiro da faculdade de medicina da USP (FMUSP), que contribuíram para a seleção dos pacientes e coleta das amostras analisadas nesta pesquisa. Às Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu (Uniguaçu), principalmente ao coordenador pedagógico prof. Marcos Joaquim Vieira e a direção que permitiram o uso do laboratório de biologia molecular para executar parte da pesquisa.

A todos minha imensa gratidão!

*“A mente que se abre para uma nova janela,
jamais volta ao tamanho original”*
(Albert Einstein)

RESUMO

O estrógeno desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e integridade do sistema músculo-esquelético feminino e masculino, influenciando inclusive disfunções do tendão tibial posterior (TTP). Alguns pacientes apresentam tendinopatia do TTP sem causa clinicamente evidente, sugerindo que fatores genéticos podem influenciar nessa disfunção. O presente estudo investigou a associação entre polimorfismos (SNP) em de receptores de estrógenos e a tendinopatia de TTP. Foram analisados os SNPs *AluI* (rs4986938 + 1730 G > A) e *RsaI* (rs1256049 + 1452 G > A) do receptor de estrógeno beta ($RE\beta$) separadamente e em combinação haplotípica, e os SNPs *PvuII* (rs 2234693 + 397 T > C) e *XbaI* (rs 9340799 + 351 A > G) do receptor de estrógeno alfa ($RE\alpha$) em combinações haplotípica. Meta-análise foi realizada a fim de esclarecer o papel dos SNPs em $RE\beta$ na fisiopatologia do sistema musculoesquelético. Um total de 400 participantes foram recrutados para análise dos SNPs *AluI* e *RsaI*, incluindo homens, mulheres no climatério (com diagnóstico clínico e laboratorial de menopausa) e mulheres sem climatério. Os participantes foram divididos em grupo amostra com diagnóstico clínico e anatomopatológico de tendinopatia do TTP e grupo controle com TTP íntegro na ressonância magnética. Células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas com bochecho de glicose 3% e tiveram seu DNA extraído com acetato de amônio. Para amplificação e digestão das amostras, utilizou-se as técnicas de reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os genótipos foram analisados através de eletroforese em géis de agarose. Para a análise haplotípica do $RE\alpha$, foram utilizados dados de projeto prévio de pesquisa realizado com 200 mulheres no climatério. Para a meta-análise, após a revisão sistemática foram selecionados 6 artigos que analisaram os SNPs *AluI* e *RsaI* em desordens musculoesqueléticas. Os resultados confirmam a associação do SNP *AluI* com a tendinopatia do TTP. Houve diferenças significativas nas frequências dos alelos entre os grupos teste e controle de homens e mulheres na pós-menopausa ($p = 0,0016$ e $p = 0,0001$), com o genótipo A/A emergindo como um efeito de risco. Comparando mulheres na pós-menopausa versus mulheres na pré-menopausa e adicionando homens, a análise mostrou diferenças significativas na distribuição alélica ($p = 0,0450$), sendo que o alelo A em mulheres na pós-menopausa pode ser considerado um fator de risco. O polimorfismo *RsaI* não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. A análise de haplótipo do $RE\beta$, mostrou que o haplótipo G-A apresenta um efeito protetor ($p \leq 0,0025$). Já para o haplótipo do $RE\alpha$ não houve diferenças estatisticamente significativas para as frequências nos grupos estudados. No estudo da meta-análise, foi encontrada associação significativa de desordens musculoesqueléticas com o genótipo recessivo (A/A) e alelo recessivo (A) do SNP *AluI*, corroborando com o resultado de nossa pesquisa. Em conclusão, SNPs em RE influencia a tendinopatia do TTP e o SNP *AluI* pode ser considerado um marcador genético de interesse na fisiopatologia dos tendões.

Palavras-chave: Tendinopatia. Receptor de estrógeno beta. Polimorfismos genéticos. Fisiopatologia. Tendão tibial posterior.

ABSTRACT

Estrogen plays a key role in the development and integrity of the female and male musculoskeletal system, influencing including dysfunctions of the posterior tibial tendon (PTT). Some patients present PTT tendinopathy with no clinically evident cause, suggesting that genetic factors may influence this dysfunction. The present study investigated the association between polymorphisms (SNP) in estrogen receptors and PTT tendinopathy. *AluI* SNPs (rs4986938 + 1730 G > A) and *RsaI* (rs1256049 + 1452 G > A) of the estrogen beta receptor (RE β) were analyzed separately and in haplotype combination, and the *PvuII* SNPs rs 2234693 + 397 T > C) and *XbaI* (rs 9340799 + 351 A > G) of the estrogen receptor alpha (RE α) in haplotypic combinations. Meta-analysis was performed to clarify the role of SNPs in RE β in the pathophysiology of the musculoskeletal system. A total of 400 participants were recruited for analysis of *AluI* and *RsaI* SNPs, including men, women in climacteric (with clinical and laboratory diagnosis of menopause) and women without climacteric. The participants were divided into a sample group with clinical and anatomopathological diagnosis of PTT tendinopathy and control group with PTT intact on magnetic resonance imaging. Epithelial cells of the buccal mucosa were collected with 3% glucose mouthwash and had their DNA extracted with ammonium acetate. For amplification and digestion of the samples, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) techniques were used and the genotypes were analyzed by electrophoresis on agarose gels. For the haplotypic analysis of the ER, we used data from a previous research project carried out with 200 women in the climacteric period. For the meta-analysis, after the systematic review, 6 articles were selected that analyzed the *AluI* and *RsaI* SNPs in musculoskeletal disorders. The results confirm the association of *AluI* SNP with PTT tendinopathy. There were significant differences in allele frequencies between the test and control groups of postmenopausal men and women ($p = 0.0016$ and $p = 0.0001$), with the A/A genotype emerging as a risk effect. Comparing postmenopausal women versus premenopausal women and adding men, the analysis showed significant differences in allelic distribution ($p = 0.0450$), and the A allele in postmenopausal women may be considered a risk factor. The *RsaI* polymorphism did not present a significant difference between the groups studied. Haplotype analysis of RE β showed that the G-A haplotype had a protective effect ($p \leq 0.0025$). For the RE α haplotype, there were no statistically significant differences for the frequencies in the studied groups. In the meta-analysis study, we found a significant association of musculoskeletal disorders with recessive (A/A) and recessive allele (A) of the *AluI* SNP, corroborating the results of our study. In conclusion, SNPs in ER influences PTT tendinopathy and *AluI* SNP can be considered a genetic marker of interest in the pathophysiology of tendons.

Keywords: Tendinopathy. Beta estrogen receptor. Genetic polymorphisms. Pathophysiology. Posterior tibial tendon.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR, NA FACE MEDIAL DO PÉ.....	20
FIGURA 2 – COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA E HOMOLOGIA ENTRE OS RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA E BETA.....	22
FIGURA 3 – FORMAS DE INTERAÇÃO HORMÔNIO/RECEPTOR.....	23
FIGURA 4 – SÍTIOS POLIMÓRFICOS <i>PVUII</i> / <i>XBAI</i> EM <i>ESR1</i> E <i>RSAI</i> / <i>ALUI</i> EM <i>ESR2</i>	27
FIGURA 5 – GEL DE AGAROSE 2% COM OS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS PELA TÉCNICA DE PCR.....	38
FIGURA 6 – RFLP QUE CONTÉM O POLIMORFISMO <i>ALUI</i> E <i>RSAI</i> EM GEL DE AGAROSE 2%.....	39
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DO CRITÉRIO DE SELEÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS NA META-ANÁLISE.....	45
FIGURA 8 – ANÁLISE DO VIÉS DE PUBLICAÇÃO	48
FIGURA 9 – ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>ALUI</i> NOS ESTUDOS.....	49
FIGURA 10 – ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>RSAI</i> NOS ESTUDOS.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS <i>PvuII</i> , <i>XbaI</i> , <i>AluI</i> E <i>RsaI</i>	29
TABELA 2 – RELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM <i>ESR1</i> E <i>ESR2</i> COM O RISCO PARA DIFERENTES PATOLOGIAS.....	30
TABELA 3 – INFORMAÇÕES SOBRE CONDIÇÕES DA TÉCNICA DE PCR E RFLP.....	37
TABELA 4 – CARACTERÍSTICA DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	41
TABELA 5 – FREQUÊNCIA TOTAL DOS ALELOS E GENÓTIPOS DE <i>AluI</i> E <i>RsaI</i>	41
TABELA 6 – FREQUÊNCIA ABSOLUTA DOS ALELOS E GENÓTIPOS DISTRIBUIDOS ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	42
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ALELOS E GENÓTIPOS ENTRE MULHERES PÓS-MENOPAUSA X HOMENS + MULHERES PRÉ-MENOPAUSA.....	43
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS SNPs <i>RsaI</i> E <i>AluI</i> REFERENTES À <i>ESR2</i> E <i>XBAI</i> E <i>PVUII</i> REFERENTES À <i>ESR1</i> NOS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	44
TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA META-ANÁLISE	46
TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO ALELO RECESSIVO DOS ESTUDOS INCUÍDOS NA META-ANÁLISE	47
TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUENCIAS DOS GENÓTIPOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA META-ANÁLISE	47
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>AluI</i> ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	49
TABELA 13 – COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>RsaI</i> ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

COL5A1 –	Gene do colágeno 5
COL11A1 –	Gene do colágeno 11
COL11A2 –	Gene do colágeno 11
DBD –	Domínio de ligação com o ácido desoxirribonucleico
EDTA –	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPH –	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ERE –	Elemento de resposta ao estrógeno
ESR1 –	Gene que codifica receptor de estrógeno alfa
ESR2 –	Gene que codifica receptor de estrógeno beta
E1 –	Estrona
E2 –	17 β -estradiol
EE2 –	17 α -etinilestradiol
E3 –	Estriol
FSH –	Hormônio folículo estimulante
GWAS –	Estudos de associação genômica
Hsp –	Proteínas <i>Heat-shock</i>
IC –	Intervalo de confiança
IMC –	Índice de massa corporal
MAF –	Alelo de menor frequência
LBD –	Domínio de ligação com o ligante
LD –	Desequilíbrio de ligação
MEC –	Matriz extracelular
MMP –	Metaloproteinase
NTD –	Domínio de ativação da transcrição
OEGE –	<i>Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies</i>
OR*	<i>Odds Ratio</i>
pb –	Pares de base
PCR –	Reação em cadeia pela polimerase
POP –	Procedimento Operacional Padrão
RE –	Receptor de estrógeno
RFLP –	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

RR –	Risco relativo
SERMs –	Moduladores seletivos dos receptores de estrógeno
SNP –	Polimorfismos em nucleotídeo único
TIMP –	Inibidor tecidual da metaloproteinase
TNC –	Gene que codifica a proteína tenascin C
TTP –	Tendão tibial posterior
UTR –	<i>Untranslated region</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 TENDINOPATIA	19
2.2 ESTRÓGENO E SEUS RECEPTORES.....	21
2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM RECEPTORES DE ESTRÓGENO	26
2.3.1 Polimorfismos genéticos e a tendinopatia	312
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 OBTENÇÃO DO DNA.....	35
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA	35
3.3 PCR E RFLP	36
3.4 ELETROFORESE	37
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
3.5.1 Análise haplotípica.....	39
3.5.2 Meta-análise	40
4 RESULTADOS	41
4.1 FREQUENCIA DOS POLIMORFISMOS <i>AluI</i> E <i>RsaI</i>	41
4.2 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS	43
4.3 META-ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS <i>AluI</i> E <i>RsaI</i> E O RISCO DE DISFUNÇÕES MUSCULOESQUELÉTICAS	44
4.3.1 Análise de <i>AluI</i>	48
4.3.2 Análise de <i>RsaI</i>	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA.....	73
ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO.....	74
ANEXO 3 - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	75
ANEXO 4 – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO	77

1 INTRODUÇÃO

Tendinopatias são lesões musculoesqueléticas comuns e representam mais de 30% de todas as consultas em clínicas de ortopedia (MAFFULLI et al., 2015). Alguns indivíduos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de alterações nos tendões, sugerindo uma possível interação entre fatores genéticos, nutricionais, estilo de vida, entre outros (MAGRA; MAFFULLI, 2007).

Diversas alterações genéticas específicas têm sido associadas à lesão no tendão, muitas vezes, envolvendo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (LONGO et al., 2014). Na tendinopatia, os genes mais estudados são os que geralmente codificam proteínas estruturais, principalmente, o colágeno, ou proteínas envolvidas no processo de reparo, como metaloproteinases de matriz ou componentes da via da apoptose celular (JOHN et al., 2016).

Observações epidemiológicas mostram que existe uma alta frequência de patologias no sistema musculoesquelético entre mulheres, principalmente após a menopausa. A tendinopatia tem um pico de prevalência da doença em indivíduos por volta dos 55 anos, sendo três vezes mais frequente em mulheres (DELAND et al., 2005). Esta elevada frequência sugere que existam mecanismos em comum na fisiopatologia do tendão com níveis hormonais (USHIYAMA et al., 1998).

Entre os hormônios esteroides, o estrógeno desempenha um papel importante na integridade do desenvolvimento esquelético feminino e masculino (USHIYAMA et al., 1998). Um aumento nos níveis de estrógeno tem um efeito positivo sobre a síntese de colágeno global (MARKIEWICZ et al., 2013), enquanto que uma diminuição na síntese de colágeno pode ser resultado do estrógeno estar abaixo dos níveis fisiológicos a nível tecidual (LIU et al., 1997; LEE et al., 2015).

Até o momento, dois receptores estrogênicos (RE) foram identificados em humanos: receptores de estrógeno alfa ($RE\alpha$), codificado pelo gene *ESR1* e beta ($RE\beta$) codificado pelo gene *ESR2*. Ambos receptores foram encontrados por Bridgeman et al., (2010) nas células do tendão tibial posterior.

Alguns autores já comprovaram a influência de polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* com diversos processos patológicos, incluindo distúrbios musculoesqueléticos (ICHIKAWA et al., 2005; KUNG et al., 2006; KOTWICKI et al., 2014), embora os SNPs em *ESR1* sejam melhores investigados que os SNPs em *ESR2* para essas patologias (SILVESTRI et al., 2006). Entre os SNPs mais bem

investigados nestes genes estão os SNPs *PvuII* (rs 2234693 – 397 T → C) e *XbaI* (rs 9340799 – 351C→G) de *ESR1* e *AluI* (rs4986938 + 1730 G > A) e *RsaI* (rs1256049 + 1452 G > A) de *ESR2* (CASAZZA et al., 2010).

Existem evidências moleculares de experimentos “*in vitro*” e com modelos animais, que apontam um papel importante destes SNPs no metabolismo ósseo (SHEARMAN et al., 2004). Como as células ósseas e musculares compartilham o mesmo precursor mesenquimal, pode-se considerar que a densidade óssea e a massa muscular também compartilhem os mesmos determinantes genéticos (KARASIK; KIEL, 2010).

Estudos histológicos demonstraram uma ausência de infiltrados inflamatórios no tendão lesado. Consequentemente, drogas antiinflamatórias convencionais têm mostrado pouca ou nenhuma eficácia no tratamento de tendinopatias. O principal desafio ao enfrentar esta doença é fornecer aos pacientes uma terapia que seja eficaz, de ação rápida e que forneça resultados duradouros (VASTA et al., 2016).

O desenvolvimento de terapêuticas efetivas para o tratamento desta patologia é dificultado pela falta de dados orientadores sobre os aspectos celulares e moleculares do desenvolvimento do tendão, transdução de sinal, transdução mecânica e mecanismos fundamentais subjacentes à patogênese e cura do tendão (ANDARAWIS et al., 2015).

A determinação de padrões genéticos, em pacientes com tendinopatias do tendão tibial posterior (TTP), parece ser importante para melhor compreensão do processo de degeneração tendínea (ALCAZAR et al., 2010). Estudos de associação dos polimorfismos genéticos com as doenças contribuem para aumentar a atribuição destes polimorfismos como biomarcadores, contribuindo para elaboração de estratégias de prevenção e terapêutica individualizadas e aumentar a taxa de sucesso dos tratamentos. Portanto, SNPs em receptores de estrógeno podem ser considerados como possíveis candidatos no desenvolvimento de distúrbios em TTP.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo investigar o papel de polimorfismos genéticos de receptores de estrógenos na tendinopatia primária do tibial posterior, em um estudo de caso-controle.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência dos polimorfismos *RsaI* e *AluI* em *ESR2*, do receptor de estrógeno beta, na fisiopatogênia da insuficiência primária do tendão tibial posterior, e assim, defini-los como possíveis marcadores genéticos relacionados em mulheres pré e pós-menopausa e em homens.
- Investigar se a combinação haplotípica dos polimorfismos *RsaI* e *AluI*, em receptores de estrógenos beta pode ser considerada fator de risco para tendinopatia em mulheres pós-menopausa.
- Investigar se a combinação haplotípica dos polimorfismos *XbaI* e *PvuII* em receptores de estrógenos alfa pode ser considerada fator de risco para tendinopatia em mulheres pós-menopausa.
- Realizar estudo de meta-análise dos polimorfismos *RsaI* e *AluI* em processos patológicos musculoesqueléticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TENDINOPATIA

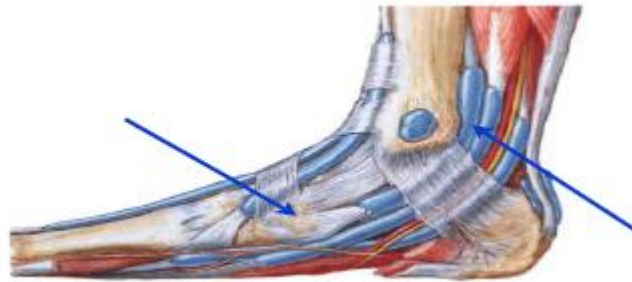
Os tendões são estruturas especializadas que conectam o músculo ao osso e transmitem as forças geradas pelo músculo ao osso (MANN; COUGHLIN, 1993). É, portanto, estrutura fundamental para o adequado desempenho mecânico do deslocamento humano (XU; MURREL, 2008).

O tendão tibial posterior (TTP), assim como os demais tendões, é formado por tecido conectivo composto por células e pela matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular é um complexo estrutural que contém três principais classes de biomoléculas: proteínas estruturais (colágeno e elastina), proteínas especializadas (fibrina e fibronectina) e proteoglicanos (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). As propriedades biomecânicas de um tendão são características da MEC, que está em constante estado de equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação de suas proteínas constituintes (JONES et al., 2006).

As células dos tendões são semelhantes a fibroblastos e são importantes para a manutenção do tendão saudável, produzindo e mantendo o colágeno da matriz extracelular (CHUEN et al., 2004). O TTP normal apresenta, em sua matriz extracelular, 95% de colágeno do tipo I e pequenas quantidades de colágeno do tipo III, IV e V. Estes componentes resultam em feixes paralelos na estrutura do tendão e conferem resistência mecânica para a tibial posterior (GONÇALVES NETO et al., 2002; SATOMI et al., 2008).

Os tendões possuem uma vascularização limitada recebendo seu suprimento sanguíneo diretamente de vasos do perímio e dos vasos do epitendão (NORDIN; FRANKEL, 2003). O TTP encontra-se anatomicamente localizado na face medial do pé (FIGURA 1).

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR, NA FACE MEDIAL DO PÉ.



LEGENDA: As setas indicam a localização do TTP. FONTE: MANN; COUGHLIN, (1993).

A tendinopatia é caracterizada por dor associada à atividade e pela diminuição de força e movimento na área afetada, levando a alteração do padrão normal da marcha e perda funcional (XU; MURREL, 2008). Alguns tendões são particularmente vulneráveis e usualmente apresentam alteração degenerativa primária, tais como: o patelar, o calcâneo, os do manguito rotador, o do bíceps do braço, o tibial posterior, os fibulares e os de Aquilles (RILEY, 2004; ABATE *et al.*, 2009)

Anormalidades crônicas no tendão, como a tendinopatia, podem ser encontradas na parte mediana do tendão, no local de inserção do tendão ao osso e no tenossinovio que envolve o tendão. No entanto, as desordens tendíneas do TTP são quase exclusivamente afetadas no local de inserção do tendão ao osso (ALMEKINDERS *et al.*, 2003).

Histologicamente, as alterações intratendinosas são frequentemente resultantes de microrupturas, que levam a degenerações colagênicas localizadas e a subsequentes degenerações mucóides ou fibroses (PANNI *et al.*, 2000). O dano na matriz do tendão é o evento primário, sobrecarregando a capacidade da população celular residente em reparar defeitos estruturais (RILEY, 2004). Como evento secundário, há evidências de que ocorram alterações nas células do tendão. Estas se apresentam mais redondas, proliferam, tornam-se necróticas ou apoptóticas antes do desenvolvimento evidente da tendinopatia (XU; MURRELL 2008).

De acordo com estudos moleculares, a tendinopatia mostra, em sua matriz extracelular, alterações nas proporções dos diferentes tipos de colágeno. Esta é uma explicação possível para a diminuição da resistência do tecido tendíneo (GONÇALVES NETO *et al.*, 2002; SILVER *et al.*, 2003).

Degenerações dos tendões são comuns e constituem problema frequente na prática médica. Afetam uma parte substancial dos atletas profissionais e recreativos e àqueles que exercem ocupações que envolvem o trabalho repetitivo (XU; MURRELL, 2008). A exposição súbita a estresses mecânicos elevados pode colocar os tecidos dos tendões em risco de dano, e a sobrecarga é amplamente considerada um fator causal no início da tendinopatia (SNEDEKER; FOOLEN, 2017).

Estudos epidemiológicos relatam que lesões por uso excessivo eram significativamente mais comuns em atletas idosos em comparação com atletas jovens (ALMEKINDERS et al., 2003). Observa-se também que há uma frequência maior desta patologia em mulheres não atletas, principalmente após a menopausa (DELAND et al., 2005), o que sugere uma relação importante dos hormônios esteróides na manutenção da homeostase tecidual.

Alguns estudos têm investigado o papel do estrógeno na biologia do tendão: Liu et al., (1997) identificaram a presença de receptores de estrógeno e progesterona nas células do tecido sinovial, nos fibroblastos e vasos do peritendão do ligamento cruzado anterior. Yu et al., (2001) correlacionaram os níveis do estradiol e da progesterona com a proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno nas células do ligamento cruzado anterior. Como resultado, observaram relação direta e positiva da concentração hormonal estrogênica com a produção celular de colágeno tipo I.

Bryant et al., (2008) avaliaram os efeitos da variação hormonal estrogênica e a sua implicação biomecânica no tendão calcâneo e encontraram uma menor resistência tendínea nas mulheres que tinham o ciclo hormonal alterado. A deficiência de estrógeno pode contribuir para a diminuição da capacidade de cicatrização de tendões (TORRICELLI et al., 2013) e está associada a alterações na proliferação celular e síntese de matriz (EWIES et al., 2008; SHEN et al., 2015).

2.2 ESTRÓGENO E SEUS RECEPTORES

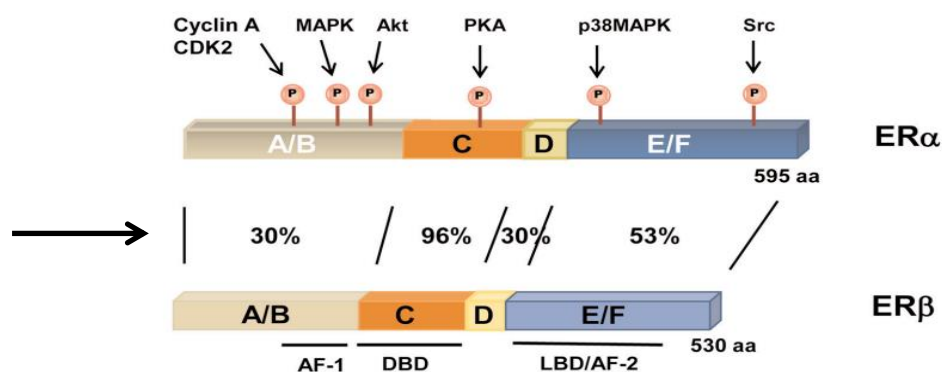
Hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células. Os estrógenos são hormônios esteroidais derivados do colesterol, classificados como 17β -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1). Há também o sintético 17α -etinilestradiol (EE2), desenvolvido para uso médico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos (SIMMONDS, 1992).

Devido a sua natureza hidrofóbica, estes hormônios se difundem pela membrana plasmática, permitindo que exerçam seus efeitos sistêmicos por ligação a seus receptores (ARAÚJO et al., 2011).

Até o momento, três distintos receptores de estrógeno foram identificados: o receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), sendo o tipo mais predominante (PAVAO e TRAISH, 2001), o receptor de estrógeno beta ($ER\beta$) (KUIPER et al., 1996) e o receptor de estrógeno gama ($ER\gamma$) (HAWKINS et al., 2000). Destas três isoformas, $ER\alpha$ e $ER\beta$ tem sido melhores investigados, ao passo que $ER\gamma$ é um emergente semelhante ao $ER\beta$, que foi detectado em alguns tipos celulares de peixes (LUCONI et al., 2002).

Os REs são proteínas modulares que partilham três domínios em comum: domínio de ativação da transcrição (NTD), domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de interação com o ligante (LBD). Estes domínios são divididos em 05 regiões distintas, conhecidas como A/B, C, D, E e F. Possuem uma extremidade amino terminal (NH₂) que precede a região A/B e uma extremidade carboxi-terminal (COOH) posterior a região F (LEITMAN et al., 2010), conforme ilustrado na FIGURA 2. Apesar de $ER\beta$ ser menor que $ER\alpha$, ambos possuem estruturas semelhantes (JIA et al., 2015).

FIGURA 2 – COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA E HOMOLOGIA ENTRE OS RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA E BETA

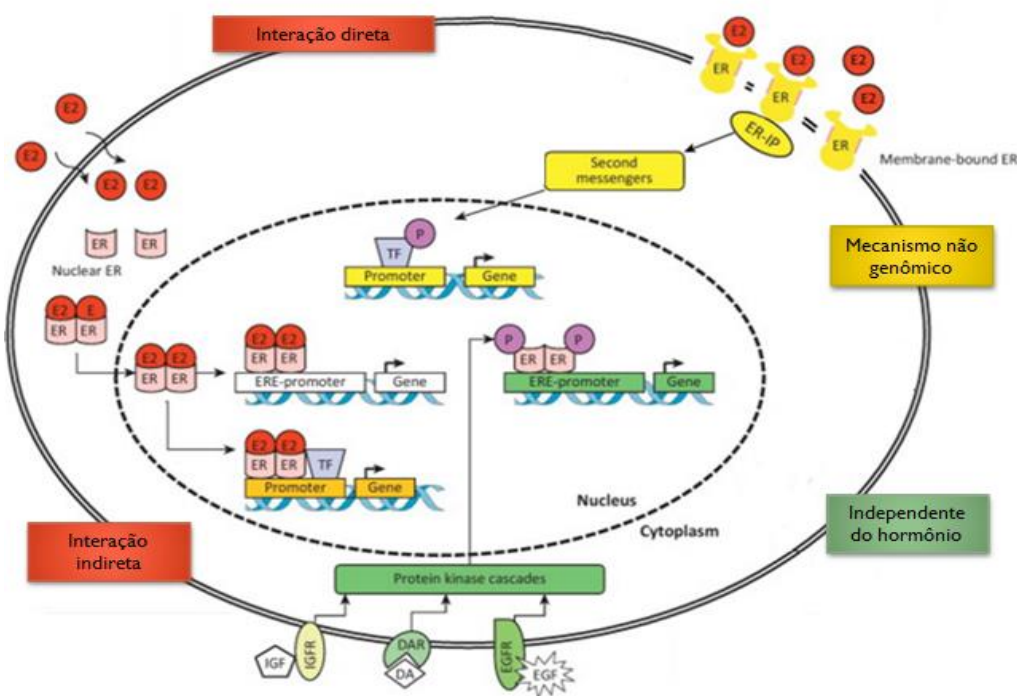


LEGENDA: A porcentagem de homologia entre os receptores está indicada pela seta. A figura indica ainda a localização de diversos locais de fosforilação em que estes receptores são ativados por quinases importantes (Akt: proteína-quinase específica de serina / treonina; CDK2, quinase 2 dependente de ciclina; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; PKA: proteína quinase A; Src: coativador do receptor de esteroides) que modulam uma grande variedade de eventos celulares. FONTE: ROMAN-BLAS et al., (2009).

Na porção final de LBD, o domínio F destes receptores possuem diferenças estruturais que permitem a ligação de várias moléculas além do hormônio como substâncias exógenas incluindo pesticidas, bisfenóis ou fitoestrógenos. Várias destas substâncias mostram atividade estrogênica, sendo chamadas coletivamente de xenoestrógenos (MARINO et al., 2012). Além destes, os receptores ligam-se a fármacos agonistas e antagonistas utilizados para o tratamento de várias doenças (KATZENELLENBOGEN et al., 2000). Esta pluralidade de ligantes explica a baixa similaridade entre os receptores na região de ligação ao hormônio.

Estes receptores são membros de uma superfamília de receptores nucleares, os quais atuam como fatores de transcrição promovendo a regulação de genes em tecidos específicos (NILSSON et al., 2004). A ativação dos REs pode ser feita através da interação direta ou indireta com o ligante (mecanismo genômico de ativação) ou por outra via de transdução de sinal (mecanismo não genômico de ativação) (LIEBERMAN, 1997), conforme ilustrado na FIGURA 3.

FIGURA 3 - FORMAS DE INTERAÇÃO HORMÔNIO/RECEPTOR.



LEGENDA: Em vermelho estão representadas as formas direta e indireta de ativação do receptor pode se ligar diretamente ao DNA ou por meio de uma conexão com outros fatores transcripcionais. Em amarelo, o mecanismo não genômico de ativação, em que o receptor está inserido na membrana citoplasmática para atividades que necessitam de uma resposta rápida. Em verde, a forma de ativação independente de hormônio, realizada por meio de fatores de crescimento que ativam cascatas de proteínas quinases. FONTE: ADAPTADO DE CUI et al., (2013).

A interação do RE ativado com o DNA também pode ocorrer de forma indireta, através de cofatores. Estes cofatores, também conhecidos como correguladores, possuem ações específicas (coativadores ou correpressores) em tipos celulares distintos (GRANDIEN et al., 1997). Estes cofatores são remodeladores de cromatina essenciais para a transcrição gênica e são necessários uma vez que a maioria das regiões genômicas onde ocorre a transcrição está na forma de heterocromatina, o que impede a interação direta do receptor com o DNA (ASCENZI et al., 2006; MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003).

Existe ainda uma forma de ativação do receptor que é independente do hormônio. Esta ativação se dá através da ligação de fatores de crescimento à seus respectivos receptores localizados na membrana celular, os quais ativam a cascata de sinalização tirosinas quinases, desencadeando processos como fosforilação, ubiquitinação, acetilação ou metilação no receptor para sua atividade transcricional (ZHAO et al., 2008).

Grissom e Daniel (2016) demonstraram através de ensaios de coimunoprecipitação em ratas ovariectomizadas que, na ausência de estrógenos ovarianos, o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1) ativa RE α de maneira independente via fosforilação na serina da posição S118, resultando em aumento da associação de RE α com o coativador do receptor de esteróide 1 e elevação de proteínas reguladas por este receptor.

REs também têm um domínio de transativação independente de ligante (AF1), que pode ser ativado através das vias de receptores de fator de crescimento epidérmico (IGFRs e EGFRs) associados à membrana celular, mesmo na ausência de estrógeno. A ativação independente de hormônio via sinalização do receptor do fator de crescimento (GFR) exibe um papel fundamental em diversas regulações fisiológicas. Baixas concentrações de estrógeno estão associadas a um aumento da sinalização de GFR, permitindo que os REs confirmem e mantenham um nível constitutivo das expressões de genes regulados pelo hormônio (SUBA, 2018).

O processo não genômico está envolvido na modulação de respostas rápidas ao estrógeno, ocorrendo alguns segundos ou minutos após o estímulo. Receptores de membrana estão envolvidos neste processo e estão localizados em discretos domínios caveolares (RAZANDI et al., 2003; SIMONCINI; GENAZZANI, 2003). Transdução de sinal pode ocorrer como resultado de estrógenos ativando

proteínas G ou RE de membranas acoplados à proteína G, as quais iniciam um processo de cascata de sinalização (KELLY et al., 2001).

REs de membrana têm sido encontrados em células do músculo liso, glândula pituitária e células endoteliais, devido a estes tecidos necessitarem de estímulo rápido para suas funções, como por exemplo, vasodilatação (RAZANDI et al., 2003). Os efeitos não genômicos do estrógeno podem regular diferentes processos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose em tipos celulares distintos (ACCONCIA; KUMAR, 2006).

Os REs são proteínas sintetizadas no citoplasma celular. São translocados para o núcleo associados a fatores de transporte (p55 e Hsp 70), pois o tamanho de exclusão do poro nuclear impossibilita que o receptor atravesse a membrana por difusão passiva. Dentro do núcleo, os REs são estocados em sua forma inativa, através da formação de um complexo de interação com proteínas heat-shock (Hsp 90 e 56) até que um estímulo próprio seja recebido (LIEBERMAN, 1997).

Uma vez que estes receptores são ativados, passam da sua forma inativa para sua forma funcionalmente ativa através de uma mudança conformacional, denominada dimerização. Isto permite ao receptor uma ligação de alta afinidade à região promotora do DNA, conhecida como elemento de resposta ao estrógeno (ERE), permitindo assim a ativação da transcrição gênica (ASCENZI et al., 2006; YAŞAR et al., 2017).

O processo de dimerização pode ocorrer por meio da formação de três complexos diferentes: homodímero RE_{α} / RE_{α} , homodímero RE_{β} / RE_{β} e heterodímero RE_{α} / RE_{β} (GRANDIEN et al., 1997). Este último é possível apenas em tecidos os quais ambos receptores são co-expressos, a exemplo do tecido mamário (JÄRVINEN et al., 2000) e do TTP (BRIDGEMAN et al., 2010). Este mecanismo torna bastante complexa a definição da função do receptor seja na sua forma individual ou combinada, dentro da célula (HERYNK; FUQUA, 2004).

As respostas transcricionais à sinalização estrogênica dependem da identidade e disponibilidade do ligante, da concentração e localização celular do receptor, dos níveis de várias proteínas correguladoras e de outros componentes de transdução de sinal, bem como o estado da cromatina (regiões de eucromatina ou heterocromatina) (ASCENZI et al., 2006). Qualquer alteração neste complexo molecular interfere diretamente na tradução proteica e consequentemente na resposta fisiológica à ação hormonal (BARONE et al., 2010).

A co-expressão de $RE\alpha$ e $RE\beta$ também pode ser considerado como um fator importante na resposta transcricional. Dos 76 genes que são regulados por $RE\beta$, 17 deles também são regulados por $RE\alpha$. $RE\beta$ inibe a proliferação celular induzida por $RE\alpha$, impactando significativamente na resposta transcricional em tecidos os quais estes receptores estão co-expressos (ZHAO et al., 2010). Além destes receptores atuarem em diversos processos fisiológicos, como a reprodução, a circulação, o metabolismo ósseo, a cognição e o comportamento (HERYNK; FUQUA, 2004), também são importantes moduladores em condições patológicas (SCHUIT et al., 2005).

2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Os mais simples e comuns de todos os polimorfismos são os polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs* - *Single Nucleotide Polymorphisms*). Um *locus* caracterizado por um SNP geralmente tem apenas dois alelos, que correspondem a duas bases diferentes que ocupam uma localização específica no genoma e possuem frequência acima de 1% na população (RA; PARKS, 2007).

Os SNPs são numerosos, aproximadamente 12 milhões, e encontram-se fartamente distribuídos ao longo do genoma. Esta troca de bases em uma determinada sequência difere entre indivíduos de mesma origem étnica, bem como entre cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo (ALTSHULER et al., 2008; MANEY, 2017). Sabe-se que, mesmo uma pequena variação no DNA, pode ter um enorme efeito na expressão de diferentes genes alvo e aumentar a susceptibilidade de algumas doenças (CAO et al., 2016).

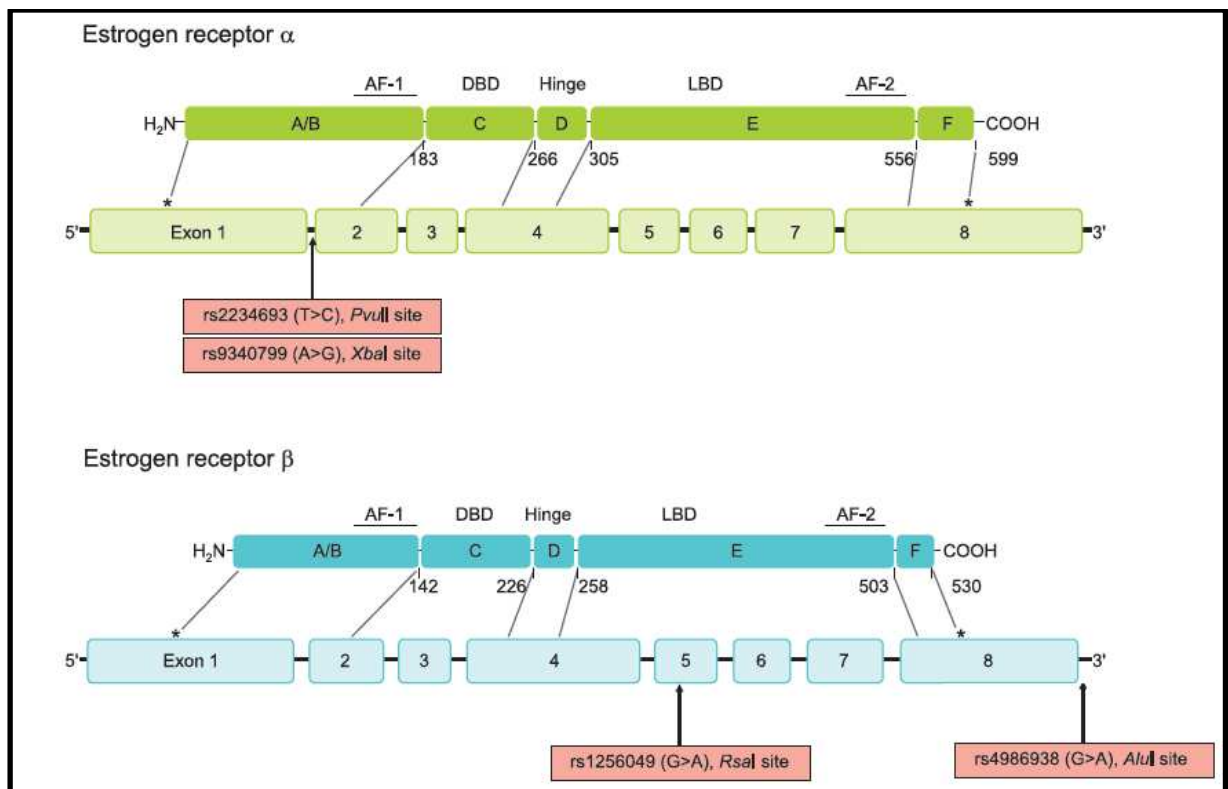
$RE\alpha$ e $RE\beta$ são produtos de dois genes diferentes: *ESR1* localizado no cromossomo 6q24-27 e que codifica $RE\alpha$ e *ESR2* que está localizado no cromossomo 14q22-24 e codifica $RE\beta$. $RE\alpha$ possui massa molecular de 66 Kilodalton (kDa) e é composto por 595 aminoácidos, enquanto que $RE\beta$ possui massa molecular de 60 kDa e é composto por 530 aminoácidos. Ambos *ESR1* e *ESR2* compreendem oito exons separados por sete introns, conforme ilustrado na FIGURA 4 (CASAZZA et al., 2010).

Até o momento, 2.334 polimorfismos genéticos já foram identificados em *ESR1* (ARAÚJO et al., 2011). Dentre estes, *PvuII* (rs 2234693) e *XbaI* (rs 9340799)

têm sido os mais extensivamente estudados. *PvuII* é definido como sendo resultado da troca do nucleotídeo timina por citosina na posição (+ 397 T > C). *XbaI* possui uma troca do nucleotídeo adenina por guanina na posição (+ 351 A > G). Estes polimorfismos estão localizados no intron 1 e estão separados por 46 pb (GENNARI et al., 2005).

No gene *ESR2*, em meio aos polimorfismos amplamente estudados, *AluI* (rs4986938) está localizado na região 3'UTR no exon 8 e *RsaI* (rs1256049) está localizado no exon 5. *AluI* é resultado de uma troca de guanina por uma adenina em região aparentemente não funcional do gene, na posição (+ 1730 G > A). *RsaI* apresenta troca do nucleotídeo guanina por adenina em região codificante, na posição (+ 1452 G > A) (GENNARI et al., 2005), resultando em uma mutação sinônima, a qual não altera a sequência de aminoácido da proteína a ser codificada (MANEY, 2017).

FIGURA 4 – SÍTIOS POLIMÓRFICOS *PVUII* / *XBAI* EM *ESR1* E *RSAl* / *ALUI* EM *ESR2*



LEGENDA: A figura representa a proteína sintetizada (em verde o receptor alfa e em azul o receptor beta). Abaixo da representação da proteína, está demonstrado o gene que codifica os receptores. Os números na figura indicam a posição do aminoácido na proteína em que as regiões A/B, C, D E e F terminam. FONTE: MUN et al., (2013).

Estes polimorfismos representam uma troca de nucleotídeo que leva à criação de um local que é reconhecido por uma enzima de restrição que corta a cadeia de DNA neste local, permitindo distinguir diferentes alelos pelo seu tamanho (polimorfismos de fragmentos de restrição de DNA, RFLPs) (HARTL; CLARK, 2010).

Geralmente estes SNPs não alteram a sequência de aminoácidos da proteína a ser codificada e, portanto, não alteram a função do receptor. No entanto, não se pode excluir a hipótese de que eles possam alterar o nível de biodisponibilidade dos receptores (NILSSON et al., 2004), bem como exercer efeito alelo específico na regulação da expressão gênica. Podem ainda estar em desequilíbrio de ligação com uma mutação funcional e servir de marcador (YE, 2000).

O efeito de um polimorfismo depende de sua localização dentro de um gene. Por exemplo, *PvuII* e *XbaI* estão localizados em um intron próximo à região promotora o que poderia alterar a metilação do promotor ou a ligação dos fatores de transcrição, afetando assim a taxa de transcrição. Mudanças intrônicas na sequência do gene podem ter um impacto na expressão de outros genes por influenciar a transcrição e/ou a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) (ARAÚJO et al., 2011). Podem também influenciar a ligação de fatores reguladores sobre o DNA, a estrutura e a estabilidade do mRNA secundário, o tráfego de ribossomos no mRNA e suas interações com ligantes específicos (FERNÁNDEZ-CALERO et al., 2016).

Ocasionalmente podem ocorrer erros durante o processo de produção do mRNA, os quais geram variantes do receptor. Estes *splicing*, também conhecidos como isoformas, dão origem a receptores truncados que podem manter a capacidade de ligação aos hormônios, mas podem perder sua capacidade como fator de transcrição (MCDONNELL; NORRIS, 2002). Diversas variantes de *splicing* de RE α e RE β foram descritas na literatura (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003).

SNPs proporcionam importantes ferramentas para estudos genéticos. Um conjunto de polimorfismos pode ser investigado em estudos de casos e controles, para avaliar se um nucleotídeo específico é mais comum em uma posição no gene em grupos casos em comparação com controles. Isso indica que o polimorfismo pode estar relacionado como um fator de risco ou proteção para doenças (ALTSHULER et al., 2008). O fato de os SNPs serem comuns, não significa que eles não apresentem efeito na saúde e na longevidade. Isto quer dizer que qualquer efeito de SNPs comuns está mais provavelmente envolvido na alteração

relativamente sutil de suscetibilidade a doenças do que na causa direta de doenças (HARTL; CLARK, 2010).

As associações genótipo-fenótipo são encontradas através da comparação de frequências de alelos entre grupos de indivíduos com e sem o fenótipo de interesse ou correlacionando a expressão fenotípica com o número de cópias de um determinado alelo. Em geral, a forma mais comum do gene na população é chamada de alelo tipo-selvagem e a sequência menos comum é chamada de alelo de menor frequência (MAF) (BUTLER, 2005).

Segundo o projeto 1000Genomas, *PvuII*, *XbaI*, *AluI* e *RsaI* apresentam variações nas frequências alélicas conforme a população estudada. Estas variações podem ser observadas na TABELA 1.

TABELA 1 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS *PvuII*, *XbaI*, *AluI* E *RsaI*

População	<i>PvuII</i> C / T	<i>XbaI</i> A / G	<i>AluI</i> G / A	<i>RsaI</i> G / A
Global	0.446 / 0.554	0.719 / 0.281	0.74 / 0.26	0.87 / 0.13
Africanos	0.57 / 0.43	0.735 / 0.265	0.746 / 0.254	0.897 / 0.103
Leste asiático	0.40 / 0.60	0.807 / 0.193	0.868 / 0.132	0.597 / 0.403
Europeus	0.422 / 0.578	0.692 / 0.308	0.623 / 0.377	0.964 / 0.036
Sul asiático	0.42 / 0.58	0.63 / 0.37	0.72 / 0.28	0.95 / 0.05
Americanos	0.35 / 0.65	0.73 / 0.27	0.74 / 0.26	0.97 / 0.03

FONTE: a autora, (2018) (ncbi.nlm.nih.gov/snp)

Quanto à avaliação da contribuição genética para o fenótipo de uma doença, é muito mais informativo ter dados de haplótipos, que apenas dados de genótipos. As combinações específicas de variações polimórficas ao longo da sequência de DNA são denominadas de haplótipos e estão relacionados à origem geográfica dessas mesmas variações. Estes polimorfismos são transmitidos em bloco de geração a geração (WALL; PRITCHARD, 2003).

Os testes baseados em haplótipos ou desequilíbrio de ligação (DL) são estimados a partir de estudos de associação probabilística dos alelos nos diferentes *locus* dos indivíduos e seu comportamento na população. Assim, quando há desvio nas frequências observadas dos haplótipos quando comparadas às esperadas, tem-se o desequilíbrio de ligação. Este desequilíbrio refere-se ao fato de que alelos

específicos em locais próximos podem co-ocorrer no mesmo haplótipo com mais frequência do que o esperado pelo acaso (HARLT; CLARK, 2010).

Conhecer as frequências dos alelos para estes *locus* de interesse não significa que sabemos como estes alelos estão distribuídos nos quatro haplótipos possíveis. Portanto, faz-se necessário também investigar a associação de haplótipos ao invés de SNPs isolados, uma vez que um haplótipo particular contendo este SNP pode ter um efeito mais forte na ocorrência da doença (GOLCHIN et al., 2016).

A maioria das variações genéticas associadas a características ou distúrbios fenotípicos, não está localizada em regiões codificadoras (93% a 96%), segundo os estudos de associação genômica (GWAS). Apenas 10% a 15% destas variações estão em desequilíbrio de ligação com uma variante de codificação de proteína. Muitas vezes, existem múltiplos SNPs em desequilíbrio de ligação com o SNP verdadeiramente funcional (MAURANO et al., 2012). De acordo com Ashton et al., (2009), tanto *PvuII*, *XbaI* quanto *AluI* e *RsaI* estão sob forte desequilíbrio de ligação.

O desequilíbrio de ligação difere entre espécies e raças (MACKAY, 2001). Os parâmetros estimados são específicos de cada população estudada. Assim, considera-se a importância de estudos específicos do desequilíbrio de ligação em diferentes populações (SCHAPER et al., 2012). Os polimorfismos *PvuII*, *XbaI*, *AluI* e *RsaI* tem sido correlacionados com diversas patologias em diferentes etnias, como pode ser visto na TABELA 2. Porém, poucos estudos trazem a informação sobre análise de haplótipos destes polimorfismos.

TABELA 2 – RELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM *ESR1* E *ESR2* COM O RISCO PARA DIFERENTES PATOLOGIAS

Referências	Patologia	SNPs	População
MONASTERO et al., 2006	Alzheimer	<i>XbaI</i>	Caucasianos
DENG et al., 2013	Alzheimer	<i>XbaI</i>	Chineses
CHENG et al., 2014	Alzheimer	<i>PvuII</i>	Caucasianos
MIN et al., 2012	Esquizofrenia	<i>PvuII</i> e <i>XbaI</i>	Chineses
WEICKERT et al., 2008	Esquizofrenia	<i>PvuII</i>	Caucasianos e Africanos
LIU et al., 2014; DAI et al., 2014	Osteoartrite	<i>XbaI</i>	Chineses
REN et al., 2015; YIN et al., 2015	Osteoartrite	<i>XbaI</i>	Asiáticos
WANG et al., 2015	Osteoartrite	<i>PvuII</i>	Chineses
LEE et al., 2014	Osteoartrite	<i>RsaI</i>	Koreanos
DING et al., 2014	Doença coronariana	<i>PvuII</i>	Asiáticos

SHEN et al., 2012; WEI et al., 2013; XU et al., 2008)	Doença coronariana	<i>Pvull</i>	Chineses
(XIE et al., 2009)	Doença coronariana	<i>Xbal</i>	Chineses
MANSUR et al., 2005	Doença coronariana	<i>Alul</i>	Chineses
HU et al., 2012	Endometriose	<i>Pvull</i>	Caucasianas
GOVINDAN et al., 2009	Endometriose	<i>Pvull</i>	Indianas
WEIDERPASS et al., 2000; ZHOU et al., 2013	Endometriose	<i>Xbal</i>	Caucasianas
BIANCO et al., 2009	Endometriose	<i>Alul</i>	Brasileiras
ASHTON et al., 2009	Cancer endometrial	<i>Pvull</i>	Australianas
CHATTOPADHYAY et al., 2014	Cancer endometrial	<i>Pvull</i>	Indianas
LI; XU, 2012	Cancer endometrial	<i>Pvull</i>	Asiáticas
CAI et al., 2003	Cancer de mama	<i>Pvull</i>	Chinesas
SHIN et al., 2003	Cancer de mama	<i>Xbal</i>	Koreanas
LI et al., 2014	Cancer de próstata	<i>Xbal</i>	Caucasianos e Africanos
GUPTA et al., 2010	Cancer de próstata	<i>Xbal</i>	Iranianos
FU et al., 2014	Cancer de próstata	<i>Pvull</i>	Caucasianos e Africanos
GU et al., 2014	Cancer de próstata	<i>Pvull</i>	Africanos
JUREČEKOVÁ et al., 2013	Cancer de próstata	<i>Pvull</i> e <i>Xbal</i>	Eslovacos
SAFARINEJAD et al., 2012	Cancer de próstata	<i>Pvull</i> e <i>Xbal</i>	Iranianos
SAFARINEJAD et al., 2012	Cancer de próstata	<i>Rsal</i>	Iranianos
DAI et al., 2014; FU et al., 2014	Cancer de próstata	<i>Rsal</i>	Caucasianos

FONTE: a autora, (2018).

2.3.1 Polimorfismos genéticos e a tendinopatia

O processo que leva à tendinopatia é multifatorial e vários fatores de risco têm sido propostos na literatura. No entanto, muitos pacientes apresentam disfunção TTP sem qualquer um desses fatores de risco ou condições sistêmicas. É possível que uma interação entre os vários fatores intrínsecos e extrínsecos com a composição genética de um dado indivíduo aumenta a probabilidade para esta patologia (VAUGHN et al., 2017).

Estudos de associação genômica têm sido realizados na busca por genes candidatos como fatores de risco para doenças específicas. Mais de 66 *locus* gênicos já foram identificados pelo GWAS para distúrbios musculoesqueléticos, confirmando assim a natureza altamente poligênica destas patologias (GOLCHIN et al., 2016).

Uma investigação sistemática da interação entre SNPs candidatos destes genes pode ser mais informativo para a avaliação do risco de desenvolvimento de alterações no sistema musculoesquelético. Os polimorfismos genéticos provavelmente influenciam a degeneração tendínea por meio do efeito acumulado de múltiplos polimorfismos, envolvendo interações complexas entre múltiplos genes (ADAMO et al., 2001).

As alterações genéticas mais estudadas em relação ao risco de tendinopatia são em genes que expressam enzimas ou codificam as proteínas estruturais relacionadas a MEC. Polimorfismos nos genes que codificam as várias moléculas de colágeno tem sido relacionados na literatura. Abrahams et al., (2013) associaram quatro polimorfismos em região 3'-UTR do gene *COL5A1* que codifica colágeno tipo V com tendinopatia do tendão de aquiles. Hay et al., (2013) encontraram associação de polimorfismos no gene *COL11A1* e *COL11A2* que codificam colágeno tipo XI com risco aumentado para tendinopatia do tendão de aquiles.

As collagenases, membros da superfamília metaloproteinase de matriz (MMPs), são algumas das poucas enzimas capazes de clivar a molécula de colágeno tipo I no ambiente extracelular (RILEY, 2004). A atividade das MMPs é bloqueada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). O equilíbrio entre as atividades das MMPs e TIMPs regula a remodelação tendínea. Um desequilíbrio nas MMPs e TIMPs está associado a distúrbios de colágeno nos tendões (MAGRA; MAFFULLI, 2005).

Magra e Maffuli (2005) constataram uma associação de polimorfismos na região promotora do gene que codifica para MMP-3 com a produção alterada da proteína em tendinócitos. Raleigh et al., (2009) encontrou associação de polimorfismos em MMP-3 com tendinopatia do tendão de aquiles. Nosso grupo, em projeto prévio, demonstrou que os polimorfismos -1607 e -519 da MMP-1 (GODOY-SANTOS et al., 2013; BARONEZA et al., 2014) e -799 da MMP-8 (GODOY-SANTOS et al., 2014) e -77 da MMP-13 (DE ARAUJO MUNHOZ et al., 2016) estão associados com a tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

Yu et al., 2011 demonstrou a atuação estrogênica sobre a transcrição de MMPs. Relatórios independentes sugerem que os receptores de estrógeno, tanto $RE\alpha$ como $RE\beta$, têm influências em diferentes MMPs (LU et al., 2007). Estes receptores atuam na região promotora do gene que codifica algumas das MMPs e assim alteram sua transcrição (ACHARI et al., 2008).

Alguns autores relataram a influência de polimorfismos genéticos em *ESR1* e *ESR2* a patologias relacionadas aos tendões como: doença do tendão calcâneo (MOKONE et al., 2006; POSTHUMUS et al., 2010), rupturas do ligamento cruzado anterior (POSTHUMUS et al., 2009), doença do manguito rotator (MOTTA et al., 2014).

Outro gene e seus polimorfismos amplamente estudados é o gene que codifica uma glicoproteína conhecida como tenascin-C (TNC) em tendões, a qual é encontrada em maior proporção nas regiões do tendão predominantemente responsáveis pela transmissão de força mecânica. Isto pode levar ao aparecimento de alterações morfológicas nos tendinócitos e eventualmente resultar em uma tendinopatia (MAGRA; MAFFULI, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada mediante parceria do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e o Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O protocolo para sua realização foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 708, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0901/09 (ANEXO 1).

Os voluntários foram recrutados entre os pacientes do Grupo de Pé e Tornozelo do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Os voluntários que aceitaram participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Uma vez que se deseja avaliar o risco genético sobre a doença, faz-se necessária a exclusão de fatores de influência como doenças reumatológicas, doenças imunológicas, diabetes, doenças hepáticas e renais, infecção ou lesão prévia ou atual na topográfica do pé e tornozelo, bem como obesidade superior ao grau I. Portanto, os pacientes que apresentaram alguma destas características foram excluídos da pesquisa.

Os voluntários incluídos no estudo foram divididos em dois grupos:

- **Grupo caso:** composto de homens e mulheres com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa do tendão tibial posterior. As mulheres foram subdivididas em 2 grupos (pós-menopausa e pré-menopausa).
- **Grupo controle:** homens e mulheres assintomáticos, com tendão tibial posterior íntegro na ressonância magnética. As mulheres serão subdivididas em 2 grupos (pós-menopausa e pré-menopausa).

Para a estratificação do grupo de mulheres, foi definido como pós-menopausa, mulheres com 12 meses de amenorreia e nível de hormônio folículo estimulante > 45 mU/ml e pré-menopausa, mulheres com ausência destes fatores clínicos (MARYFRAN et al., 2008).

Esta pesquisa foi realizada por cegamento, sendo que a autora não teve acesso prévio aos grupos de análise. O estudo do polimorfismo genético de *AluI* e *RsaI* foi realizado na Universidade Federal do Paraná. A análise dos polimorfismos de *PvuII* e *XbaI* foi realizada previamente em parceria com grupo de pesquisa do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, para relação haplotípica destes polimorfismos abordada neste estudo. A análise do “*status*” hormonal também foi realizada previamente pelo grupo de estudo parceiro, mediante quantificação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e estradiol, para a alocação das pacientes do gênero feminino nos respectivos grupos de análise.

3.1 OBTENÇÃO DO DNA

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por meio de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva), durante 2 minutos, conforme protocolo modificado de Trevilatto; Line, (2000). O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois, constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA.

Após a coleta, foi adicionado 1ml de solução TNE (10mM Tris pH 8, 150mM NaCl e 2mM EDTA) e 1ml de etanol 70% a solução para posterior congelamento e transporte do material. O material foi congelado a -20°C e transportado até a Universidade Federal do Paraná por empresa credenciada, conforme o Procedimento Operacional Padrão (POP) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de Adair; Line, (2007), por meio da adição de 1,3 µl de solução de lise (10 mM Tris pH 8.0, 0,5% SDS, 5 mM EDTA). As amostras foram incubadas *overnight* com 10 µl de proteinase K (20 mg/ml – solução mãe) da marca (*Sigma Chemical® Co., St Louis, MO, USA*) a 50°C. Após esse processo, foram adicionados 500 µl de solução de acetato de amônio

(10mM com EDTA 1mM) e vortexados por aproximadamente 5 minutos para desmanchar o pellet. Centrifugado a 14000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e adicionados 540 µl de isopropanol para cada 900 µl da solução contendo DNA. Após nova centrifugação, o pellet foi submetido a lavagem com etanol a 70% e, posteriormente, seco por 15 minutos a 37 °C. O DNA foi submetido a suspensão em 100 µl de tampão *TE* (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) a temperatura ambiente por três horas.

3.3 PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) E RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

A técnica de *PCR* foi utilizada para amplificação dos fragmentos dos genes dos receptores de estrógeno beta. A reação foi feita com volume final de 25µl contendo: 12.5µl de *GoTaq® Green Master Mix*, 2X (20 picomols); 1.0 µl de cada iniciador (*forward* e *reverse*) (25 mM); 2.0µl da amostra de DNA (~ 100 ng), padronizado após quantificação do DNA por espectrofotômetro L-Quant 2®; (q.s.p. 25 µl) de água ultra pura *nuclease free*.

A *GoTaq® Green Master Mix* é fornecida em 2X de tampão de reação Green (pH 8,5), 400 µM de cada um dos dNTPs, e 3 mM de MgCl₂. O tampão desta reação contém um composto que aumenta a densidade da amostra, e corantes amarelos e azuis, que funcionam como corantes de carga quando os produtos da reação são analisados por eletroforese em gel de agarose. A mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento (conforme TABELA 3) e extensão a 72°C, 1 minuto em cada temperatura; e por fim 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores, pela técnica de RFLP. A digestão foi realizada com volume final de 10µl, sendo: 5µl do produto de PCR, 1µl da enzima (0,1 U) acrescido de 2µl de seu respectivo tampão, 2µl de água ultra pura por aproximadamente 2 horas a 37°C em estufa com enzima de restrição específica para cada sítio polimórfico.

TABELA 3 - INFORMAÇÕES SOBRE CONDIÇÕES DA TÉCNICA DE PCR E DE RFLP

SNP	Primers 5'→3'	Anelamento	PCR e Fragmentos da RFLP
<i>RsaI</i> rs1256049	F: TTCTGAGCCGAGGTCGTAGT R: TGAATCCTTGGACCCAACCTC	61°C	GT*AC = 293 pb / 289 pb 582 pb
<i>AluI</i> rs4986938	F: GTGTGTGGTGGGACACAGAG R: AGGCCATTGAGTGTGGAAAC	62°C	AG*CT = 445 pb / 201 pb 646 pb

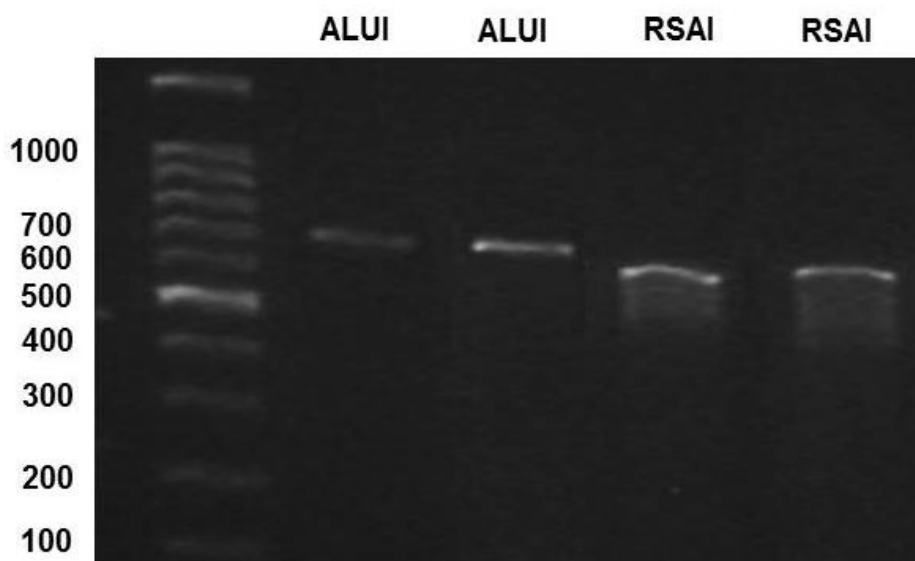
FONTE: a autora, (2018).

3.4 ELETROFORESE

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis horizontais de Agarose 2% e a corrida em Tampão TBE 1X (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). A preparação do gel de Agarose 2% foi feita com 1,8 gramas de Agarose (Marca: Pronadisa®), 0,9 ml de TBE 5X acrescida de 80 ml de água destilada. A mistura foi aquecida em micro-ondas em potência alta por até 1 minuto, com pausas para misturar.

Para confirmação da amplificação (PCR) e para a análise da RFLP, utilizou-se volume total de 5µl da reação de PCR ou RFLP e 1,5µl do reagente Gel Red (Marca: Biotium®) e 2µl de azul de bromofenol. A mistura foi aplicada em géis horizontais de Agarose 2%, em cuba de eletroforese horizontal (Marca Uniscience® – 10x10 cm), e submetida a uma corrente elétrica de 100V; 120mA e 60W por tempo específico para cada fragmento (entre 30 e 60 minutos). Os padrões das bandas dos respectivos polimorfismos estão representados na FIGURA 5.

FIGURA 5 - GEL DE AGAROSE 2% COM OS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS PELA TÉCNICA DE PCR

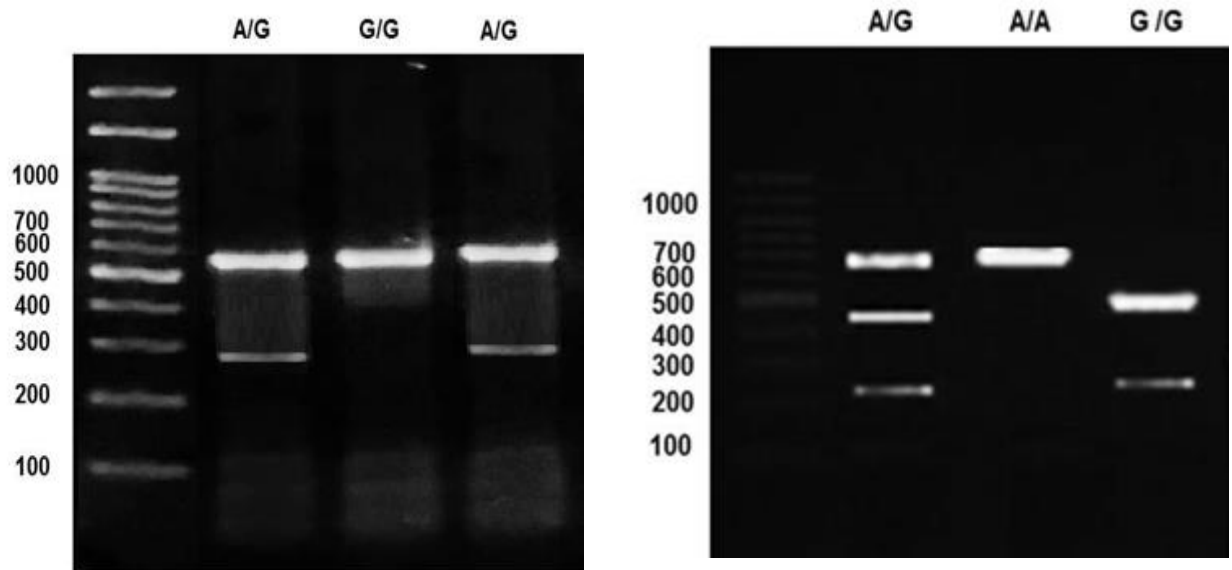


LEGENDA: *Alul*: ~ 650 pb; *RsaI*: ~ 600 pb. FONTE: a autora, (2018).

Para a análise da RFLP, observa-se o padrão das bandas obtidas após a digestão com a enzima de restrição. A enzima de restrição *RsaI* reconhece o sítio polimórfico quando este apresenta o alelo A, clivando o fragmento total de 582 pb em dois fragmentos de 293 e 289 pb (TABELA 3). Portanto, quando é visualizada apenas uma banda em aproximadamente 600 pb, significa que a amostra é homozigota G/G, pois a enzima não reconheceu o sítio polimórfico. Para heterozigose observa-se uma banda em aproximadamente 600 pb relativa ao alelo G e uma banda em aproximadamente 300 pb relativa ao alelo A. Para amostras homozigotas A/A observa-se apenas uma banda em aproximadamente 300 pb. Devido à proximidade dos pares de base da clivagem, em agarose não é possível visualizar as duas bandas (293 e 289 respectivamente).

A enzima de restrição *Alul* reconhece no sítio polimórfico o alelo G. Quando observamos em gel de agarose o produto da digestão, tem-se para amostras homozigotas A/A o fragmento total de aproximadamente 650 pb, pois não houve a clivagem pela enzima. Para amostras heterozigotas A/G, 3 fragmentos são observados em ~650 pb, ~450 pb e ~200 pb. Para amostras homozigotas G/G observam-se dois fragmentos resultantes da clivagem do fragmento total em ~450 pb e ~200 pb. A padronização da técnica de RFLP está ilustrada na FIGURA 6.

FIGURA 6 – RFLP QUE CONTÉM O POLIMORFISMO *ALUI* E *RSAL* EM GEL DE AGAROSE 2%



LEGENDA: Padrão de bandas de *AluI* à esquerda e *RsaI* à direita. FONTE: a autora, (2018).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de Mann-Whitney para variáveis independentes e o teste exato de Fisher para variáveis categóricas foram utilizados para determinar quaisquer diferenças significativas entre as idades, IMC, hipertensão, hipotireoidismo e tempo de menopausa em participantes com menopausa, pelo programa Bioestat. 5.0. O teste do *Qui quadrado* foi aplicado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, correção de Bonferroni e para comparar as frequências de alelos e genótipos de SNPs no gene RE- β entre os grupos, utilizando o software OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies*) de livre acesso no endereço eletrônico: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>

3.5.1 Análise haplotípica

A análise estatística da estimativa de haplótipos foi realizada utilizando os softwares SNPstats de livre acesso no endereço eletrônico: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>.

3.5.2 Meta-análise

Em estudos de meta-análise, são analisados diferentes modelos de efeito em relação à amostragem. Nesta meta-análise, foram verificadas as estimativas de efeito entre os estudos usando o método de Mantel-Haenszel para o modelo de efeito fixo. Estudos com maior poder estatístico (estudos com maior população e maior efeito de intervenção) têm mais "peso". Neste caso, o método de efeitos fixos, assume que todos os estudos apontaram para o mesmo efeito. O modelo de efeito aleatório DerSimonian e Laird foi utilizado para derivar as estimativas de risco relativo (RR) global e os intervalos de confiança de 95% (IC). Quando há diversidade e heterogeneidade, utiliza-se o modelo de efeitos aleatórios, que distribui o peso de forma mais uniforme, valorizando a contribuição de pequenos estudos (LAU et al., 1998).

A variância (t^2) entre os estudos foi utilizada para quantificar o grau de heterogeneidade. Estudos com uma estimativa precisa do tamanho do efeito da população (baixa variância) recebem mais peso, enquanto os estudos com uma estimativa menos precisa do tamanho do efeito da população (alta variância) recebem menos peso. O teste Qui quadrado foi utilizado para calcular o risco relativo (RR) das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos amostra e controle. Também foi calculada a frequência alélica de *AluI* e *RsaI* separadamente, através do programa MedCalc®, disponível gratuitamente através do endereço eletrônico: <https://www.medcalc.org/calc>. Para esta meta-análise foi utilizado o programa R v. 3.4.2., utilizando o pacote *metafor*.

4 RESULTADOS

Neste estudo de caso-controle, foram obtidos dados de 400 participantes, sendo 200 indivíduos com disfunções em TTP pertencentes ao grupo caso e 200 ao grupo controle com ausência de qualquer disfunção em TTP (TABELA 4). Estes números fornecem um bom poder estatístico para detectar uma relação clinicamente relevante dos SNPs estudados e o risco de desenvolvimento da patologia. As variáveis IMC, hipertensão, hipotireoidismo e tempo de menopausa entre os grupos teste e controle em cada subgrupo (mulheres na pós-menopausa, mulheres na pré-menopausa e homens) não revelaram diferenças significativas, bem como idade entre os grupos.

TABELA 4 – CARACTERÍSTICA DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

População	Com disfunção	Sem disfunção	Média idade (Desvio padrão)
Homens	50	50	53,9 ± (6,15)
Mulheres pré-menopausa	50	50	45,9 ± (3,87)
Mulheres pós-menopausa	100	100	58,4 ± (5,28)

FONTE: a autora, (2018).

4.1 FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS *AluI* E *RsaI*

A partir das distribuições dos genótipos *AluI* e *RsaI*, foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Diz-se que as amostras estão em equilíbrio quando o valor de *p* é maior que 0.05 (NAMIPASHAKI et al., 2015). As frequências relativas (**f**) e absolutas (**n**) dos alelos e genótipos estão apresentadas na TABELA 5.

TABELA 5 - FREQUÊNCIA TOTAL DOS ALELOS E GENÓTIPOS DE *AluI* E *RsaI*

SNP	Alelo (f)	Homozigose (n)	Heterozigose (n)	EHW
<i>AluI</i>	A: 0.43 / G: 0.57	AA: 67 / GG: 126	AG: 207	0.25
<i>RsaI</i>	A: 0.03 / G: 0.98	AA: 0 / GG: 380	AG: 20	0.61

LEGENDA: (f): Frequência relativa; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. FONTE: a autora, (2018).

Foi confirmada a associação de *Alul* à disfunção de TTP. Houve diferenças significativas nas frequências dos alelos entre os grupos teste e controle de homens e mulheres na pós-menopausa ($p = 0,0016$ e $p = 0,0001$). A análise genotípica mostrou o genótipo A/A emergindo como um efeito de risco (TABELA 6). O SNP *Rsal* não apresentou diferenças nas frequências de alelos e genótipos entre os grupos.

TABELA 6 – FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E GENÓTIPOS DISTRIBUIDOS ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE

SNP		Mulheres pós-menopausa		Mulheres pré-menopausa		Homens	
AluI	Alelo	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
	A	48 (96)	32 (64)	23 (46)	16,5 (33)	35,5 (71)	16,5 (33)
	G	52 (104)	68 (136)	27 (54)	33,5 (67)	14 (29)	34,5 (69)
	X ²	p = 0.0016		p = 0.0826		p = 0.0001	
	OR (IC 95%)	1.96 (1.31-2.95)		-		5.12 (2.82-9.32)	
	Genótipo	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
	A/A	10,5 (21)	3,5 (07)	06 (12)	1,5 (03)	11 (22)	01 (02)
	A/G	27 (54)	25 (50)	11 (22)	13,5 (27)	13,5 (27)	13,5 (27)
	G/G	12,5 (25)	21,5 (43)	08 (16)	10 (20)	0,5 (01)	10,5 (21)
X ²	p = 0.0026		p = 0.0417		p = 0.0001		
OR (IC 95%)	2.26 (1.24-4.13)		1.42 (0.62-3.22)		35.49 (4.53-277.8)		
RsaI	Alelo	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
	A	03 (06)	02 (04)	0	01 (02)	2,5 (05)	1,5 (03)
	G	97 (194)	98 (196)	50 (100)	49 (98)	47,5 (95)	48,5 (97)
	X ²	p = 0.7508		p = 0.4975		p = 0.7209	
	Genótipo	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
	A/A	-	-	-	-	-	-
	A/G	03 (06)	02 (04)	0	01 (02)	2,5 (05)	1,5 (03)
	A/A	47 (94)	48 (96)	25 (50)	24 (48)	22,5 (45)	23,5 (47)
	X ²	p = 0.7475		p = 0.4949		p = 0.4918	

LEGENDA: Os valores são expressos em porcentagem, com o número de sujeitos (N) entre parênteses. FONTE: a autora, (2018).

Considerando o grupo disfunção TTP e comparando mulheres na pós-menopausa versus mulheres na pré-menopausa e adicionando homens, a análise mostrou diferenças significativas na distribuição alélica ($p = 0,0450$): o alelo A em mulheres na pós-menopausa pode ser considerado um fator de risco (TABELA 7).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ALELOS E GENÓTIPOS ENTRE MULHERES PÓS-MENOPAUSA X HOMENS + MULHERES PRÉ-MENOPAUSA

SNP		Mulheres pós-menopausa	Homens + Mulheres pré-menopausa
A/IuI	<i>Alelo</i>	Casos	Casos
	A	48 (96)	58,5 (117)
	G	52 (104)	41,5 (83)
	χ^2	p = 0.0450	
	OR (IC 95%)	1.53 (1.03-3.77)	
	<i>Genótipo</i>	Casos	Casos
	A/A	10,5 (21)	17 (34)
	A/G	27 (54)	24,5 (49)
	G/G	12,5 (25)	8,5 (17)
	χ^2	p = 0.890	
RsaI	<i>Alelo</i>	Casos	Casos
	A	03 (06)	2,5 (05)
	G	97 (194)	97,5 (195)
	χ^2	p = 1.0000	
	<i>Genótipo</i>	Casos	Casos
	A/A	-	-
	A/G	03 (06)	2,5 (05)
	G/G	47 (94)	97,5 (195)
	χ^2	p = 1.0000	

LEGENDA: Os valores são expressos em porcentagem, com o número de sujeitos (N) entre parênteses. FONTE: a autora, (2018).

4.2 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS

Para análise dos haplótipos somente os grupos das mulheres em menopausa foram utilizados. Os polimorfismos utilizados para a inferência dos haplótipos foram ordenados segundo a disposição desses nos cromossomos: *RsaI* e *AluI*, *XbaI* e *PvuII*, respectivamente.

Para o REβ ambos os grupos apresentaram 3 haplótipos em comum e o grupo controle apresentou 1 haplótipo raro diferente, totalizando 4 haplótipos encontrados nesse estudo. Observou-se ainda que o haplótipo mais frequente em ambos os grupos foi o G-G. A frequência do haplótipo G-A apresentou diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,0025$), mesmo após a correção de Bonferroni, representando um risco a proteção à tendinopatia do tibial posterior (OR 1.87, IC

95% (1.24-2.84)). Análise de haplótipos global indicou uma diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,003$).

Para os SNPs no gene do $RE\alpha$ ambos os grupos apresentaram 4 haplótipos, sendo o mais comum o haplótipo A-G. Não houve diferenças estatisticamente significativas para as frequências de haplótipos nos grupos estudados. As frequências de cada haplótipo e o valor de p e OR (IC 95%) podem ser visualizadas na TABELA 8.

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS SNPS *RSAL* E *ALUI* REFERENTE À *ESR2* E *Xbal* E *PvuII* REFERENTE À *ESR1* NOS GRUPOS AMOSTRA E CONTROLE

SNPs	Haplótipos	(f) Total	(f) Controle	(f) Casos	Valor de p	OR* (95%CI)	Bonferroni
<i>Rsal</i> e <i>AluI</i>	1 G-G	0,60	0,67	0,52	-	1	$p < 0,01$
	2 G-A	0,38	0,30	0,44	0,0025	1,87 (1.24 – 2.84)	
	3 A-A	0,02	0,01	0,03	0,2	0,26 (0.03 – 2.07)	
	4 A-G	0,003	0,009	0	-	-	
<i>Xbal</i> e <i>PvuII</i>	1 A-T	0,29	0,22	0,34		1	$p < 0,01$
	2 A-C	0,24	0,28	0,23	0,18	1,68 (0,79-3,56)	
	3 G-T	0,23	0,21	0,23	0,07	2,14 (0,93-4,90)	
	4 G-C	0,23	0,29	0,20	0,29	1,42 (0,74-2,72)	

LEGENDA: (f): Frequência relativa. OR*: *Odds Ratio*. FONTE: a autora, (2018).

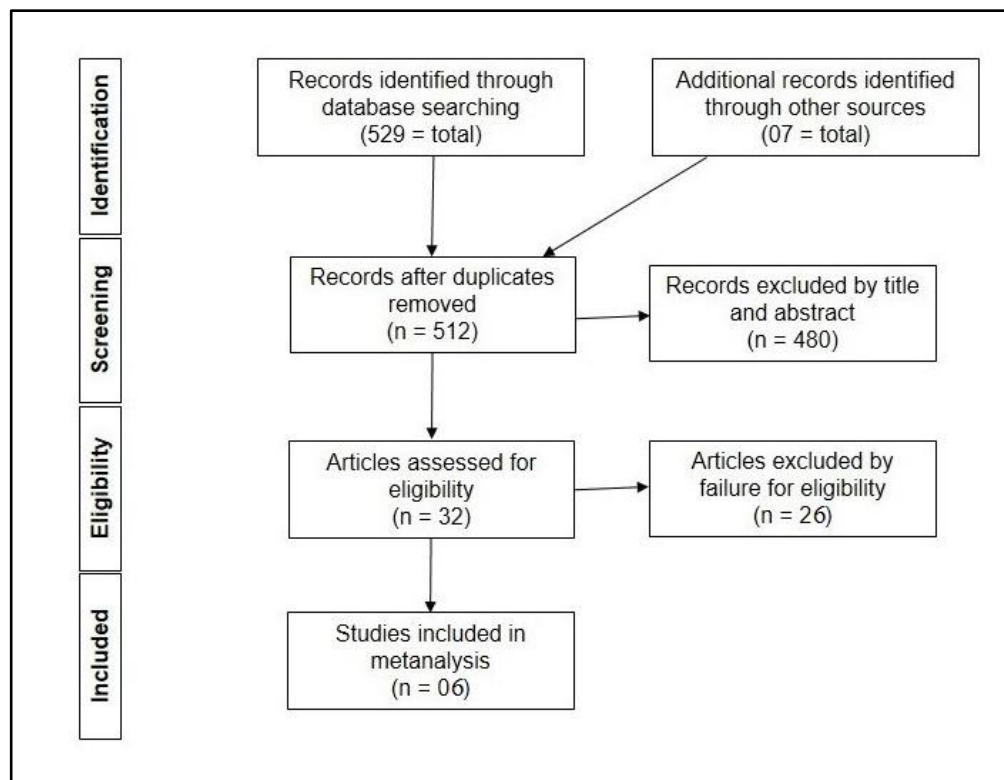
4.3 META-ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *ALUI* E *RSAL* E O RISCO DE DISFUNÇÕES MUSCULOESQUELÉTICAS

Diversos estudos investigaram a correlação entre *AluI* e *Rsal* e a suscetibilidade a distúrbios musculoesqueléticos, e nenhuma conclusão definitiva foi alcançada em relação a esses polimorfismos. Estudos de meta-análise fornecem uma maneira de resolver essas discrepâncias e têm sido usados com sucesso para definir o papel desses genes candidatos no fenótipo das doenças.

Um fator relevante que foi considerado na escolha dos polimorfismos investigados nesta meta-análise é que os SNPs em *ESR1* são melhores investigados do que os SNPs em *ESR2* para essas patologias. Portanto, objetivou-se investigar se há associação entre polimorfismos *AluI* e *RsaI* em *ESR2* com patologias musculoesqueléticas, uma vez que existem poucos estudos destes polimorfismos com disfunções dos tendões, insuficientes para uma correlação estatística eficaz.

Uma revisão sistemática da literatura foi realizada para avaliar a possível interação entre polimorfismos no gene que codifica RE β com distúrbios musculoesqueléticos. A busca foi realizada nas bases de dados PubMed (Medline), Web of Science e Scopus, durante o mês de junho de 2017. Para as palavras-chave de busca foram utilizados os termos: *ESR2* (AND) gene (AND) polymorphisms (AND) risk (AND) factor (AND) disease (OR) Estrogen (AND) Receptor (AND) gene (AND) polymorphisms (AND). Uma pesquisa manual foi realizada no Google Scholar. O critério de seleção dos artigos está representado na FIGURA 7.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DO CRITÉRIO DE SELEÇÃO DOS ARTIGOS INCLUIDOS NA META-ANÁLISE.



FONTE: a autora, (2018).

Vários estudos foram excluídos por falha de elegibilidade devido ao acesso incompleto ao artigo ($n = 3$), pela linguagem ($n = 1$). Alguns artigos ($n = 22$), não puderam ser incluídos na meta-análise porque os resultados estavam incompletos. Foram incluídos na meta-análise exclusivamente estudos com seres humanos, estudos investigando apenas distúrbios musculoesqueléticos, apenas polimorfismos *RsaI* (rs1256049) e *AluI* (rs4986938) em estudos caso-controle ou coorte.

Seis estudos foram selecionados, totalizando 2.199 participantes (1.367 casos e 1.020 controles). Destes, cinco estudos (EFSTATHIADOU et al., 2015; HARSLOF et al., 2010; KOTWICKI et al., 2014; MORON et al., 2006; SHOUKRY et al., 2015) foram usados para avaliar o *AluI*, com um total de 1.081 casos e 832 controles e quatro estudos (EFSTATHIADOU et al., 2015; KOTWICKI et al., 2014; LEE et al., 2014; SHOUKRY et al., 2015) para avaliar o polimorfismo *RsaI* totalizando 817 casos e 781 controles.

TABELA 9 – CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA META-ANÁLISE

Estudo (ano)	Patologia	População	Total (n)	Média idade (Desvio padrão)	Qualidade*
Kotwicki (2014)	Escoliose idiopática	Caucasianas	491	Não informado	5
Lee (2014)	Osteoartrite	Asiáticas	580	61.3 (não informado)	5
Shoukry (2015)	Diminuição da DMO	Egípcias	380	54.4 ± (4.4)	8
Harslof (2010)	Fratura vertebral	Caucasianos	574	62.3 ± (11.2)	7
Morón (2006)	Osteoporose	Caucasianas	265	61.3 ± (7.9)	6
Efstathiadou (2006)	Diminuição da DMO	Caucasianas	147	4.1 ± (7.9)	5

LEGENDA: *Qualidade do estudo baseada na escala de qualidade Newcastle-Ottawa para estudos não randomizados; DMO: Densidade Mineral Óssea. FONTE: a autora, (2018).

A escala de Newcastle-Ottawa (NOS) (HARTLING et al., 2013) foi usada para avaliar a qualidade dos estudos não randomizados. Cada estudo incluído foi julgado em três perspectivas gerais: a seleção dos grupos de estudo; a

comparabilidade dos grupos; e a determinação do resultado de interesse. O escore de avaliação da qualidade total foi relatado para cada estudo na TABELA 9.

Os modelos dominante (AA + AG vs GG) e recessivo (GG + AG vs AA) foram aplicados para avaliar a correlação entre esses polimorfismos e o risco de distúrbios musculoesqueléticos. Foi realizada uma análise de proporção entre os alelos dominantes e recessivos apenas do grupo de mulheres de cada estudo, somando 915 mulheres no grupo caso e 905 no grupo controle, sendo este valor relativamente superior ao número de homens analisados.

TABELA 10 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO ALELO RECESSIVO DOS ESTUDOS INCLuíDOS NA META-ANÁLISE

Estudo (ano)	SNP	Frequência caso	Frequência controle
Kotwicki et al., (2014)	<i>Alul</i>	A: 0.68	A: 0.69
Kotwicki et al., (2014)	<i>Rsal</i>	A: 0.10	A: 0.07
Lee et al., (2014)	<i>Rsal</i>	A: 0.65	A: 0.51
Shoukry et al., (2015)	<i>Alul</i>	A: 0.88	A: 0.69
Shoukry et al., (2015)	<i>Rsal</i>	A: 0.26	A: 0.20
Morón et al., (2006)	<i>Alul</i>	A: 0.74	A: 0.63
Efstathiadou et al., (2006)	<i>Alul</i>	A: 0.45	A: 0.41
Efstathiadou et al., (2006)	<i>Rsal</i>	A: 0.08	A: 0.09
Harslof et al., (2010)	<i>Alul</i>	A: 1.11	A: 1.29

FONTE: a autora, (2018).

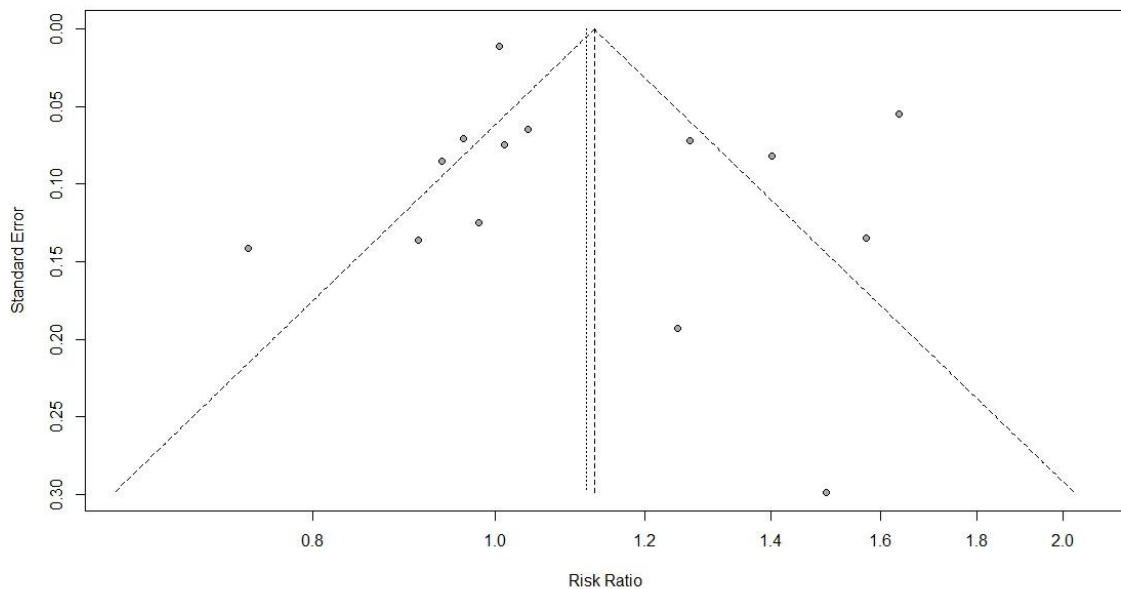
TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS DOS ESTUDOS INCLuíDOS NA META-ANÁLISE

Referência	Snp	Homozigoto casos (n)	Homozigoto controles (n)	Heterozigotos casos (n) / controles(n)
Kotwicki (2014)	<i>Alul</i>	AA: 29 / GG: 109	AA: 26 / GG: 100	AG: 110 / AG: 117
Kotwicki (2014)	<i>Rsal</i>	AA: 0 / GG: 222	AA: 0 / GG: 226	AG: 26 / AG: 17
Lee (2014)	<i>Rsal</i>	AA: 55 / GG: 101	AA: 22 / GG: 144	AG: 130 / AG: 128
Shoukry (2015)	<i>Alul</i>	AA: 52 / GG: 75	AA: 30 / GG: 85	AG: 73 / AG: 65
Shoukry (2015)	<i>Rsal</i>	AA: 2 / GG: 150	AA: 1 / GG: 144	AG: 48 / AG: 35
Morón (2006)	<i>Alul</i>	AA: 11 / GG: 23	AA: 34 / GG: 65	AA: 54 / GG: 78
Efstathiadou (2006)	<i>Alul</i>	AA: 37 / GG: 26	AA: 26 / GG: 28	Não informado
Efstathiadou (2006)	<i>Rsal</i>	AA: 7 / GG: 58	AA: 6 / GG: 76	Não informado
Harslof (2010)	<i>Alul</i>	AA: 30 / GG: 128	AA: 45 / GG: 99	AG: 131 / AG: 137

FONTE: a autora, (2018).

Um gráfico de funil de Begg (*funnel plot*) foi usado para avaliar o viés de publicação para todos os modelos alélicos. O resultado não mostrou assimetria óbvia, indicando nenhum viés de publicação (FIGURA 8).

FIGURA 8 – ANÁLISE DO VIÉS DE PUBLICAÇÃO



FONTE: a autora, (2018).

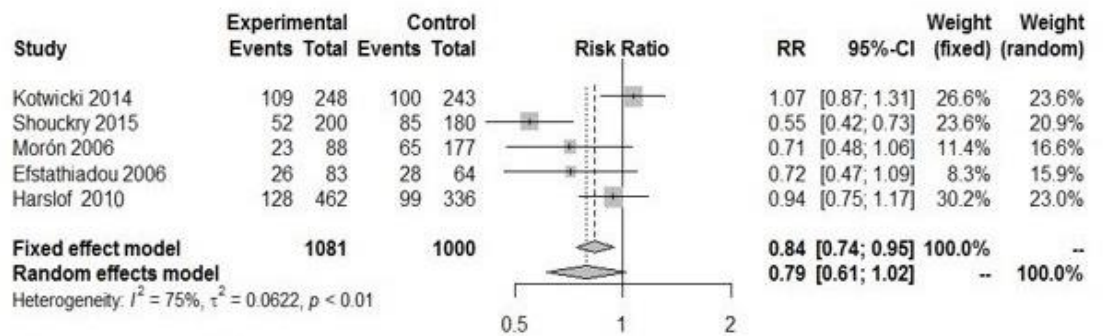
4.1.1 Análise de *Alul*

De acordo com a FIGURA 9, o genótipo dominante (visto em A), não conferiu risco para nenhum dos distúrbios musculoesqueléticos avaliados. No estudo de Shoukry et al., (2015), esta tendência foi confirmada, uma vez que o seu intervalo de confiança não toca nas linhas das estimativas de efeito do gráfico. Neste mesmo estudo, houve uma tendência do modelo recessivo em conferir risco para distúrbios musculoesqueléticos estudados.

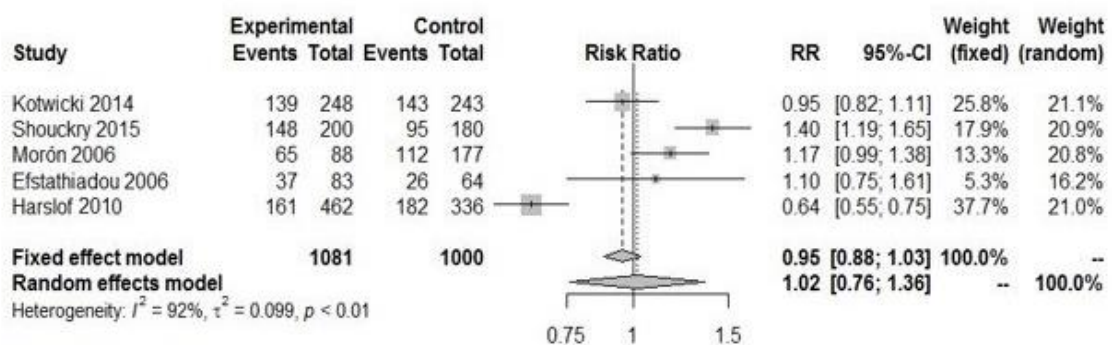
A frequência do alelo recessivo de *Alul* foi proporcionalmente mais elevada em mulheres do grupo caso, (33,9%; 44,2%; 44,6%) em relação aos controles (32,7%, 33,2%; 31,3%), respectivamente (KOTWICKI et al., 2014; SHOUCKRY et al., 2015; EFSTATHIADOU et al., 2006). Em relação à proporção de distribuição alélica, pode-se observar que a diferença na distribuição do alelo recessivo foi estatisticamente significativa apenas no estudo realizado por Shoukry et al., (2015)

(TABELA 12), podendo este alelo ser considerado um fator de risco para distúrbios musculoesqueléticos.

FIGURA 9 – ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *A1u1* NOS ESTUDOS



(A) Dominant *AluI*



(B) Recessive *AluI*

EM (A): MODELO DE GENÓTIPO DOMINANTE (GG vs AA + AG); EM (B): MODELO DE GENÓTIPO RECESSIVO (AA vs GG+ AG). FONTE: A AUTORA, (2017).

TABELA 12 – COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE *A1u1* ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE

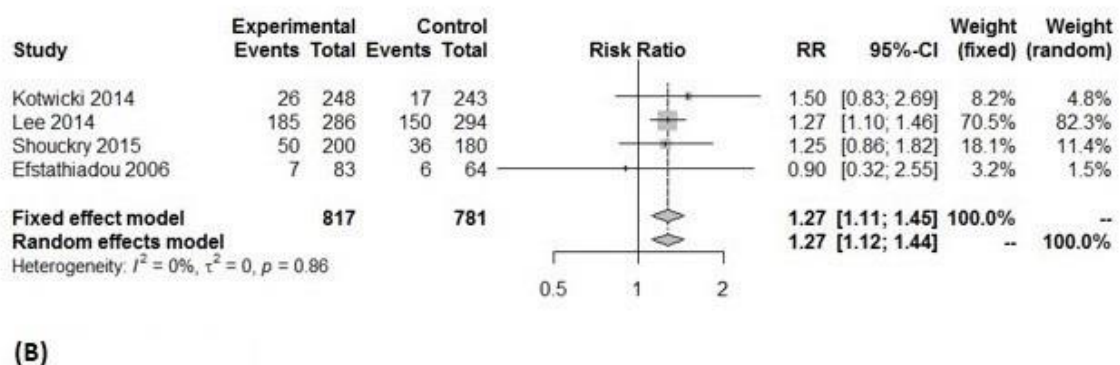
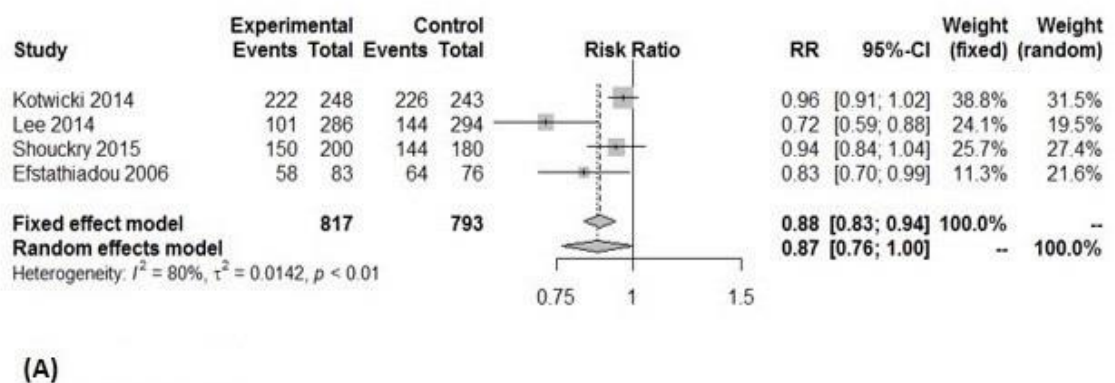
Estudo	OR* (IC 95%)	Valor de p
Kotwicki 2014	0.96 (0.71 – 1.30)	0.8060
Shouckry 2015	1.87 (1.32 – 2.65)	0.0005
Morón 2006	1.08 (0.71 – 1.63)	0.7218
Efstathiadou 2006	1.53 (0.74 – 3.19)	0.2533
Harslof 2010	0.81 (0.61 – 1.06)	0.1255

LEGENDA: OR*: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança. FONTE: a autora, (2018).

4.1.2 Análise de *RsaI*

Na análise deste polimorfismo, foi observada uma tendência do modelo genotípico dominante em não conferir risco para disfunções musculoesqueléticas, porém, esta tendência não trouxe resultados estatisticamente significantes, já que todas as linhas dos intervalos de confiança tocam as linhas do gráfico. Em relação ao modelo genotípico recessivo (em B), observou-se uma tendência ao risco, mas também não apresentou resultados estatisticamente significativos (FIGURA 10).

FIGURA 10 – ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *RsaI* NOS ESTUDOS



LEGENDA: Em (A): Modelo de genótipo dominante (GG vs AA + AG); Em (B): Modelo de genótipo recessivo (AA vs GG+ AG). FONTE: a autora, (2018).

O estudo de Lee et al., (2014) mostrou uma frequência de 52,2% do alelo recessivo A no grupo de casos, sendo essa frequência estatisticamente significativa (TABELA 13). Entretanto, na análise genotípica, o modelo recessivo não apresentou resultado significativo.

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE *RsaI* ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE

Estudo	OR* (IC 95%)	Valor de p
Kotwicki 2014	1.56 (0.82 – 2.95)	0.1743
Shouckry 2015	1.26 (0.78 – 2.02)	0.3463
Efstathiadou 2006	1.53 (0.49 – 4.79)	0.4666
Lee 2014	1.45 (1.10 – 1.92)	0.0085

LEGENDA: OR*: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança. FONTE: a autora, (2018).

5 DISCUSSÃO

Polimorfismos em genes que codificam o receptor de estrógeno podem atuar na variação individual dos níveis hormonais (ALCAZAR et al., 2010), sendo fator importante a ser investigado na fisiopatologia do tecido musculoesquelético. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relaciona os polimorfismos *Alul* e *RsaI* do gene que codifica o RE β com TTP.

Nesta pesquisa, foi identificada uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *Alul* de RE β e a tendinopatia do TTP. Em cada subgrupo, o alelo A e o genótipo A/A foram mais prevalentes no grupo caso, o que permite levantar a hipótese de que esses possam ser um fator de risco para esta patologia nos diferentes gêneros.

Apesar da homeostase do sistema musculoesquelético em mulheres esteja predominantemente sob controle do estrógeno, em homens, os andrógenos e estrógenos desempenham papel comparável (ZOFKOVA, 2008). Nos homens, a deficiência da aromatase resulta em falha na conversão da testosterona em estrógeno. Esta condição, associada a alterações nos receptores de estrógeno, têm sido associadas a desordens musculoesqueléticas no gênero masculino (MORISHIMA et al., 1995).

Considerando o SNP *RsaI*, não houve diferenças significativas nas frequências de alelos e genótipos entre os grupos caso e controle. No entanto, este SNP mostra uma baixa frequência de heterozigose, e nenhum dos participantes do estudo foi homozigoto A/A. De fato, a frequência desse alelo é baixa tanto na população global (dados mostrados na TABELA 1) quanto na brasileira (MATTOS et al., 2014).

Stavrou et al., (2006) realizaram estudo sobre a influência de polimorfismos em *ESR2* com a idade da menarca de meninas do noroeste da Grécia e a variante polimórfica de *RsaI* não foi encontrada em nenhuma das meninas examinadas, indicando que esse polimorfismo também pode ser raro em populações gregas ou do sul da Europa. Estudos sobre a associação deste SNP com populações maiores seria necessário para investigar melhor sua relação com o risco de desordens musculoesqueléticas.

Alguns estudos têm identificado outros SNPs de *ESR2* com disfunções nos tendões. Bonato et al., (2016) identificaram que o SNP rs6574293 no gene *ESR2* foi

associado com distúrbios temporomandibulares. Os autores demonstraram também que os SNPs rs10132091 e rs4903399 foram associados com indivíduos que apresentavam distúrbios temporomandibulares e doença do manguito rotador concomitantemente (BONATO et al., 2016).

Motta et al., (2014) identificaram dois SNPs (rs4903399 e rs1676303) no gene *ESR2* que foram significativamente mais representados no grupo de doença do manguito rotador, comparado aos controles, enquanto Teerlink et al., (2015) mostrou que o SNP rs17583842 no mesmo gene foi significativamente associado com o rasgo do manguito rotador.

Ainda não está clara a atuação do estrogênio no metabolismo tendíneo, bem como o papel dos polimorfismos genéticos em seus receptores na fisiopatologia das distúrbios musculoesqueléticas, principalmente ao que se refere aos tendões. Entre as possíveis explicações de como este polimorfismo pode atuar neste sistema é que, mudanças intrônicas nos genes podem ter um impacto sobre a biodisponibilidade dos receptores, influenciando a transcrição de genes responsivos ao estrogênio (ARAÚJO et al., 2011). Isto pode acarretar uma alteração da ligação dos fatores de transcrição ou atuar sobre o processamento e estabilidade do mRNA.

Outra possível explicação é que alterações nos níveis de estrogênio tem um efeito sobre a síntese de colágeno global e estes polimorfismos podem refletir na biodisponibilidade do receptor no tecido (ARKO et al., 2002), contribuindo assim para a alteração em diferentes colágenos do TTP. Os REs tem importante função no processo de biossíntese de colágeno e a proporção da expressão do receptor é importante na manutenção da homeostase do tecido (MARKIEWICZ et al., 2013).

É possível que o polimorfismo *AluI* possa estar em desequilíbrio com uma variante funcional e assim modular a expressão do mRNA de RE (NILSSON et al., 2007), uma vez que este polimorfismo se encontra em região intrônica. Para isso, seria importante a investigação de haplótipos em vez de apenas SNPs. Um SNP pode não mostrar associação específica com a doença, mas um haplótipo particular contendo este SNP pode ter um efeito mais forte sobre a ocorrência da doença (GOLCHIN et al., 2016).

Nossos resultados sugerem que o haplótipo G-A dos polimorfismos *AluI* e *RsaI* pode representar um fator de risco para tendinopatia do tibial posterior, sugerindo que ambos polimorfismos apresentam efeitos simultâneos na tendinopatia do TTP.

Nosso grupo de pesquisa correlacionou os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* de *ESR1*, que codifica o RE α , com disfunções em TTP. *XbaI* foi relacionado com o risco de desenvolvimento da tendinopatia, sendo que o genótipo A/A foi o mais prevalente na população teste (PONTIN et al., 2018). *PvuII* não apresentou frequências genotípicas estatisticamente significativas para esta população de estudo. Maruyama et al., (2000) descrevem que a presença do alelo T dominante de *PvuII* pode aumentar a atividade do receptor, ou seja, traz efeitos benéficos ao tecido. Contrapondo esta afirmação, Gold et al., (2004) estudaram estes polimorfismos em estudo de caso-controle de câncer de mama e sugerem que o alelo mais frequente desse polimorfismo (T) elimina um sítio de ligação funcional para o fator de transcrição B-myb que pode, portanto, regular negativamente a transcrição.

Um fator importante a ser analisado nesta contradição é o tipo de tecido-alvo para o receptor. Maruyama et al., (2000) analisaram a influência destes polimorfismos na atividade transcricional de pacientes com Alzheimer. Isto indica que diferenças podem ser encontradas em relação à transcrição em diferentes atividades celulares específicas. Em nosso estudo, a análise de haplótipos de *PvuII* e *XbaI* do gene *ESR1* não apresentou diferença estatística significativa para esta disfunção, sugerindo que esses SNPs não apresentam um fator simultâneo de risco a TTP. No entanto, fazem-se necessários mais estudos para compreender os mecanismos fisiopatológicos do estrógeno nos tendões.

A fim de compreender melhor a relação dos polimorfismos *AluI* e *RsaI* com a fisiopatologia do sistema musculoesquelético, foi realizada uma meta-análise destes polimorfismos com diferentes desordens deste tecido. Como as células ósseas e musculares compartilham o mesmo precursor mesenquimal, pode-se considerar que a densidade óssea e a massa muscular também compartilhem dos mesmos determinantes genéticos (KARASIK; KIEL, 2010), fornecendo dados mais concisos sobre a atuação destes polimorfismos no tendão.

Com base nos resultados da meta-análise, o modelo genotípico recessivo do polimorfismo *AluI* (A/A) pode ser considerado um importante polimorfismo de risco para distúrbios musculoesqueléticos, mas não o polimorfismo *RsaI*, o que contribui com os resultados obtidos em nossa pesquisa com tendinopatia do TTP.

Shoukry et al., (2015) investigaram o polimorfismo *AluI* e sua influência na perda óssea em mulheres, influenciando na fisiopatologia da osteoporose após a menopausa. Morón et al., (2006) sugerem que *AluI* ou uma variante funcional em

desequilíbrio de ligação com este marcador poderia ter um papel na osteoporose em mulheres espanholas pós-menopáusicas, no entanto, não foi descrito em seu estudo qual modelo de genótipo confere risco para esta patologia. Em nossa meta-análise seus resultados não apresentaram valor estatístico significativo.

Em contraste, Harslof et al., (2010) mostraram que o modelo de genótipo recessivo *Alul* não apresentou risco, mas proteção à fratura vertebral para homens e mulheres caucasianos. No entanto, quando analisado o alelo recessivo (A), apenas o estudo de Shoukry et al., (2015) apresentou um resultado estatisticamente significativo (TABELA 9). Ainda assim, Khosla; Riggs, (2005) relatam que indivíduos com alelos dominantes podem ter mais benefícios com os efeitos protetores do estrogênio no osso.

Uma possível explicação para essa discrepância entre os estudos pode ser porque a população de Harslof et al., (2010) foi composta por ambos os gêneros e avaliou a fratura vertebral. Kerkhof et al., (2010) descreve que efeitos significativos não são observados em homens, uma vez que homens idosos apresentam níveis mais elevados de estradiol em comparação com mulheres na pós-menopausa. Esses altos níveis séricos estrogênicos em homens podem mascarar uma sinalização prejudicada de $RE\beta$ causada pela variação genética. Os SNPs selecionados para uma população podem não funcionar bem para uma população diferente (BUSH; MOORE, 2012).

Estudos de meta-análise avaliam a inconsistência de dados (I^2) entre os estudos selecionados, através do gráfico *forest plot*. Essa análise de inconsistência avalia se a heterogeneidade entre os estudos é verdadeira (quando as diferenças entre os estudos não podem ser explicadas pelo acaso) ou quando essa heterogeneidade é falsa (quando é possível detectar se há erros metodológicos que causam viés). Quando o percentual de inconsistência é superior a 75%, há uma considerável heterogeneidade entre os estudos; no entanto, isso não está relacionado ao erro de amostragem, mas devido a diferenças entre gênero, idade, população, entre outras variáveis confundidoras (HIGGINS et al., 2003).

Em nossa meta-análise, houve heterogeneidade significativa e acreditamos que isso ocorreu porque os estudos selecionados usaram populações diferentes. Embora a seleção de caso adequada tenha sido feita em todos os estudos incluídos, apenas quatro estudos selecionaram controles da comunidade e dois estudos recrutaram controles de hospitais ou não mencionaram mais detalhes sobre.

Analisando os resultados em conjunto, podemos afirmar que SNPs em RE influenciam a disfunção do TTP tanto em mulheres quanto em homens. Estudos de influência destes polimorfismos na tendinopatia do TTP em diferentes etnias são necessários para determinar uma melhor relação destes na fisiopatologia da doença, uma vez que frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas variam entre diferentes populações. Genes que são altamente associados com a tendinopatia podem ser úteis na construção de um painel genético para pacientes que tiveram as lesões tendinosas.

Na degeneração tendínea, como em qualquer processo multifatorial, a combinação de vários SNPs pode agir sinergicamente para elevar a suscetibilidade e levar a alterações fisiológicas significativas. Apesar das tendinopatias representarem um processo influenciado por diversos fatores, inclusive hormonais, até o momento o papel do estrogênio e seus receptores não é totalmente compreendido. Nesse sentido, a análise SNPs e seus haplótipos em RE parecem ser de grande valor para compreensão da tendinopatia no TTP e dos mecanismos de compensação funcional do indivíduo.

6 CONCLUSÕES

O polimorfismo *Alul* (rs4986938 + 1730 G > A) no gene *ESR1* está associado à insuficiência TTP na população brasileira, com risco adicional em mulheres pós-menopausadas e em homens. O polimorfismo *RsaI* (rs1256049 + 1452 G > A) não apresentou risco para o desenvolvimento da tendinopatia em TTP na população estudada.

A análise de haplótipos para os polimorfismos *RsaI* e *Alul* dos genes *ESR2* que codifica o receptor beta apresentou associação com a insuficiência de TTP, sendo que o haplótipo G-A representa um fator de proteção.

A análise de haplótipos para os polimorfismos *XbaI* e *PvuII* dos genes *ESR1* que codifica o receptor alfa não apresentou associação com a insuficiência de TTP.

A meta-análise contribui com os resultados obtidos em nossa pesquisa com tendinopatia do TTP, reforçando que *Alul* (rs4986938 + 1730 G > A) é um marcador genético de interesse para patologias do sistema musculoesquelético.

REFERÊNCIAS

- ABATE, M.; GRAVARE-SILBERNAGEL, K.; SILJEHOLM, C.; LORIO, A.D.; AMICIS, D.D.; SALINI, V. *et al.* Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration. **Arthritis Research & Therapy**. v.11, n.3, 2009.
- ABRAHAMMS, Y.; LAGUETTE, M-J.; PRINCE, S.; COLLINS, M. Polymorphisms within the COL5A1 3-UTR that alters mRNA structure and the MIR608 gene are associated with achilles tendinopathy. **Annals of human genetics**. v. 77, n. 3, p. 204–214, 2013.
- ACCONCIA, F.; KUMAR, R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. **Cancer Letters**. v. 238, p. 1–14, 2006.
- ACHARI, Y.; LU, T.; HART, D. A. Polymorphisms in the promoter regions for human MMP-1 and MMP-13 lead to differential responses to the alpha and beta isoforms of estrogen receptor and their ligand in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1782, p. 391–400, 2008.
- ADAIR, M.; LINE, S. R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from bucal epithelial cells. **Braz Dent J**. v.18, p.148-52, 2007.
- ADAMO, C. T.; MAILHOT, J. M.; SMITH, A. K.; BORKE, J. L. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. **J Oral Implantol**. v.27, p.25-31, 2001.
- ALCAZAR, L. P.; ARAKAKI, P.; GODOY-SANTOS, A. A.; SANTOS, M. Estrogen Receptor Polymorphism and Its Relationship to Pathological Process. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 340, n. 2, p. 128–132, 2010.
- ALMEKINDERS, L. C.; WEINHOLD, P. S.; MAFFULLI, N. Compression etiology in tendinopathy. **Clinics in Sports Medicine**. v. 22, n. 4, p. 703–710, 2003.
- ALTSHULER, D.; DALY, M. J.; LANDER, E. S. Genetic Mapping in Human Disease. **Science**. v. 322, p. 881-888, 2008.
- ANDARAWIS-PURI, N.; FLATOW, E. L.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 33, n. 6, p. 780–784, 2015.
- ARAÚJO, K. L. REZENDE, L. C. D.; SOUZA, L. S.; DALTOÉ, R. D.; MADEIRA, K. P.; PAES, M. F.; HERKENHOFF, F. L.; RANGEL, L. B. A.; SILVA, I. V. Prevalence of estrogen receptor alpha *PvuII* (c454-397T>C) and *XbaI* (c454A>G) polymorphisms in a population of Brazilian women. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 54, n. 6, p. 1151–1158, 2011.
- ARKO, B.; PREŽELJ, J.; KOMEL, R.; KOCIJANCI, A.; MARC, J. No major effect of estrogen receptor beta gene *RsaI* polymorphism on bone mineral density and response to alendronate therapy in postmenopausal osteoporosis. **Journal of**

Steroid Biochemistry and Molecular Biology. v. 81, n. 2, p. 147–152, 2002.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; MARINO, M. Structure-function relationship of estrogen receptor alfa and beta: Impact on human health. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 27, n. 4, p. 299–402, 2006.

ASHTON, K. A.; PROIETTO, A.; OTTON, G.; SYMONDS, I.; MCEVOY, M.; ATTIA, J.; GILBERT, M.; HAMANN, U.; SCOTT R. J. Estrogen receptor polymorphisms and the risk of endometrial cancer. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology.** v. 116, n. 8, p. 1053–1061, 2009.

BARONE, I.; BRUSCO, L.; FUQUA, S. A. W. Estrogen Receptor Mutations and Changes in Downstream Gene Expression and Signaling. **Clin Cancer Res.** v. 16, n. 10, p. 2702–2708, 2010.

BARONEZA, J. E. J. E.; GODOY-SANTOS, A.; MASSA, B. F.; MUNHOZ, F. B. A.; FERNANDES, T. D.; SANTOS M. C. L. G. MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy. **Gene.** v. 547, n. 2, p. 334–337, 2014.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; MAFRA, F. A.; BRANDES, A.; ZULLI, K.; BARBOSA, C. P. +1730 G/A polymorphism of the estrogen receptor beta gene (ERbeta) may be an important genetic factor predisposing to endometriosis. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica.** v. 88, n. 12, p. 1397–401, 2009.

BONATO, L. L.; QUINELATO, V.; PINHEIRO, A. R.; AMARAL, M. V. G.; SOUZA, F. N.; LOBO, J. C.; AGUIAR, D. P.; AUGUSTO, L. M. M.; VIEIRA, A. R.; SALLES, J. I.; et al. ESRRB polymorphisms are associated with comorbidity of temporomandibular disorders and rotator cuff disease. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.** v. 45, n. 3, p. 323–331, 2016.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol.** v.200, p.423–428, 2003.

BRIDGEMAN, J.T.; ZHANG, Y.; DONAHUE, H.; WADE, A. M.; JULIANO, P. J. Estrogen receptor expression in posterior tibial tendon dysfunction: a pilot study. **Foot & Ankle Int.**v.31, n.12, p.1081-84, 2010.

BRYANT, A. L.; CLARK, R. A.; BARTOLD, S.; MURPHY, A.; BENNELL, K. L.; HOHMANN, E.; MARSHALL-GRANDINISK, S.; PAYNE, C.; CROSSLEY, K. M. Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. **J Appl Physiol.** v.105, p.1035-43, 2008.

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PLoS Computational Biology.** v. 8, n. 12, 2012.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers.** Elsevier Academic Press. p. 201-239, 2005.

CAI, Q.; SHU, X-O.; JIN, F.; DAI, Q.; WEN, W.; CHENG, J-R.; GAO, Y-T.; ZHENG, W. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor α gene and risk of breast cancer:

Results from the Shanghai breast cancer study. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. v. 12, n. 9, p. 853–859, 2003.

CAO, J.; KONG, L.; DING, W.; ZHANG, Y.; DEPARTMENT, Y. S. Association of estrogen receptor gene polymorphisms and idiopathic scoliosis: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**. v. 9, n. 3, p. 5359–5365, 2016.

CASAZZA, K.; PAGE, G. P.; FERNANDEZ, J. R. The association between the rs2234693 and rs9340799 estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk factors for cardiovascular disease: a review. **Biological research for nursing**. v. 12, n. 1, p. 84–97, 2010.

CHATTOPADHYAY, S.; SIDDIQUI, S.; AKHTAR, S.; NAJM, M. Z.; DEO, S. V. S.; SHUKLA, N. K.; HUSAIN, S. A. Genetic polymorphisms of *ESR1*, *ESR2*, *CYP17A1*, and *CYP19A1* and the risk of breast cancer: a case control study from North India. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**. v. 35, n. 5, p. 4517–4527, 2014.

CHENG, D.; LIANG, B.; HAO, Y.; ZHOU, W. Estrogen receptor α gene polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: evidence from a meta-analysis. **Clinical interventions in aging**. v. 9, p. 1031–8, 2014.

CHUEN, F. S.; CHUK, C. Y.; PING, W. Y.; NAR, W. W.; KIM, H. L.; MING, C. K. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. **J Histochem Cytochem**. v.52, p.1151–1157, 2004.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**. v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

DAI, Z.-J.; WANG, B.-F.; MA, Y.-F.; KANG, H.-F.; DIAO, Y.; ZHAO, Y.; LIN, S.; LV, Y.; WANG, M.; WANGET, X.-J. Current evidence on the relationship between rs1256049 polymorphism in estrogen receptor-beta gene and cancer risk. **International journal of clinical and experimental medicine**. v. 7, n. 12, p. 5031–5040, 2014.

DE ARAUJO MUNHOZ, F. B.; BARONEZA, J. B.; GODOY-SANTOS, A.; FERNANDES, T. D.; BRANCO, F. P.; ALLE, L. F.; SOUZA, R. L.; SANTOS, M. C. L. G. Posterior tibial tendinopathy associated with matrix metalloproteinase 13 promoter genotype and haplotype. **Journal of Gene Medicine**. v. 18, n. 11–12, p. 325–330, 2016.

DELAND, J. T.; ASLA, R. J.; SUNG, I. H.; ERNBERG, L. A.; POTTER, H. G. Posterior tibial tendon insufficiency: Which ligaments are involved? **Foot and Ankle International**. v. 26, n. 6, p. 427–435, 2005.

DENG, J.; CHENG, S.; WANG, Y.; ZHANG, M.; YAN, J.; FU, X.; CHEN, Y.; ZHOU, H. Association between the polymorphism of estrogen receptor alpha and Alzheimer's disease in Chinese population. **Clinical laboratory**. v. 59, n. 7–8, p. 741–6, 2013.

DING, J.; XU, H.; YIN, X.; ZHANG, F-R.; PAN, X-P.; GU, Y-A.; CHEN, J-Z.; GUO, X-G. Estrogen receptor α gene *PvuII* polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis of 21 studies. **Journal of Zhejiang University. Science. B.** v. 15, n. 3, p. 243–55, 2014.

EFSTATHIOU, Z. A.; SAKKAB, C.; POLYZOS, S. A.; GOUTOUB, M.; STAKIAS, N.; BARGIOTA, A.; KOUKOULIS, G. N. Associations of estrogen receptor alpha and Beta gene polymorphisms with lipid levels and insulin resistance in men. **Metabolism: clinical and experimental.** v. 64, n. 5, p. 611–617, 2015.

EWIES, A. A. A.; ELSHAFIE, M.; LI, J.; STANLEY, A.; THOMPSON, J.; STYLES, J.; WHITE, I.; AL-AZZAWI, F. Changes in transcription profile and cytoskeleton morphology in pelvic ligament fibroblasts in response to stretch: The effects of estradiol and levormeloxifene. **Molecular Human Reproduction.** v. 14, n. 2, p. 127–135, 2008.

FERNÁNDEZ-CALERO, T.; CABRERA-CABRERA, F.; EHRLICH, R.; MARÍN, M. Silent Polymorphisms: Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties? **Life.** v. 6, n. 1, p. 9, 2016.

FU, C.; DONG, W-Q.; WANG, A.; QIU, G. The influence of *ESR1* rs9340799 and *ESR2* rs1256049 polymorphisms on prostate cancer risk. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.** v. 35, n. 8, p. 8319–28, 2014.

GENNARI, L.; MERLOTTI, D.; PAOLA, V.; CALABRÒ, D.; BECHERINI, L.; MARTINI, G.; NUTI, R. Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis: A HuGE. **American Journal of Epidemiology.** v. 161, n. 4, p. 307–320, 2005.

GODOY-SANTOS, A.; CUNHA, M. V.; ORTIZ, R. T.; FERNANDES, T. D.; MATTAR JUNIOR, R.; SANTOS, M. C. L. G. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. **Journal of Orthopaedic Research.** v. 31, n. 7, p. 1103–1107, 2013.

GODOY-SANTOS, A.; ORTIZ, R. T.; MATTAR JUNIOR, R.; FERNANDES, T. D.; SANTOS, M. C. L. G. MMP-8 polymorphism is genetic marker to tendinopathy primary posterior tibial tendon. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.** v. 24, n. 1, p. 220–223, 2014.

GOLCHIN, M. M.; HEIDARI, L.; GHADERIAN, S. M. H.; AKHAVAN-NAKI, H. Osteoporosis: A Silent Disease with Complex Genetic Contribution. **Journal of Genetics and Genomics.** v. 43, n. 2, p. 49–61, 2016.

GOLD, B.; KALUSH, F.; BERGERON, J.; SCOTT, K.; MITRA, N.; WILSON, K.; ELLIS, N.; HUANG, H.; CHEN, M.; LIPPERT, R.; et al. Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk. **Cancer research.** v. 64, n. 24, p. 8891–8900, 2004.

GONÇALVES NETO, J.; WITZEL, S. S.; TEODORO, W. R.; et al. Changes in

collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. **Joint Bone Spine**. v.69, p.189-94, 2002.

GOVINDAN, S.; SHAIKA, N. A.; VEDICHERLAA, B.; KODATIA, V.; RAOC, K. P.; HASAN, Q. Estrogen receptor-alpha gene (T/C) *PvuII* polymorphism in endometriosis and uterine fibroids. **Disease markers**. v. 26, n. 4, p. 149–54, 2009.

GRANDIEN, K.; BERKENSTAM, A.; GUSTAFSSON, J. A. The estrogen receptor gene: Promoter organization and expression. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 29, n. 12, p. 1343–1369, 1997.

GRISSOM, E. M.; DANIEL, J. M. Evidence for ligand-independent activation of hippocampal estrogen receptor α by IGF-1 in hippocampus of ovariectomized rats. **Endocrinology**. v. 157, n. 8, p. 3149-3156, 2016.

GU, Z.; WANG, G.; CHEN, W. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis involving 18 studies. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**. v. 35, n. 6, p. 5921–30, 2014.

GUPTA, L.; THAKUR, H.; SOBTI, R. C.; SETH, A.; SINGH, S. K. Role of genetic polymorphism of estrogen receptor-alpha gene and risk of prostate cancer in north Indian population. **Molecular and cellular biochemistry**. v. 335, n. 1–2, p. 255–61, 2010.

HARSLOF, T.; HUSTED, L. B.; CARSTENS, M.; STENKJÆR, L.; LANGDAHL, B. L. Genotypes and haplotypes of the estrogen receptor genes, but not the retinoblastoma-interacting zinc finger protein 1 gene, are associated with osteoporosis. **Calcified tissue international**. v. 87, n. 1, p. 25–35, 2010.

HARTL, D. L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. 4th Edition. Sunderland, MA, USA., 2010

HARTLING, L.; MILNE, A.; HAMM, M. P.; VANDERMEER, B.; ANSARI, M.; TSERTSVADZE, A.; DRYDEN, D. M. Testing the Newcastle Ottawa Scale showed low reliability between individual reviewers. **J Clin Epidemiol**. v. 66, p. 982–993, 2013.

HAWKINS, M. B.; THORNTON, J. W.; CREWS, D.; SKIPPER, J. K.; DOTTE, A.; THOMAS, P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. **PNAS**. v. 97, n. 20, p. 10751–10756, 2000.

HAY, M.; PATRICIOS, J.; COLLINS, R.; BRANFIELD, A.; COOK, J.; HANDLEY, C. J.; SEPTEMBER, A. V.; POSTHUMUS, M.; COLLINS, M. Association of type XI collagen genes with chronic Achilles tendinopathy in independent populations from South Africa and Australia. **British Journal of Sports Medicine**. v. 47, n. 9, p. 569–574, 2013.

HERYNK, M. H.; FUQUA, S. A. W. Estrogen Receptor Mutations in Human Disease. **Endocrine Reviews**. v. 25, n. August, p. 869–898, 2004.

HIGGINS, J. P. T.; THOMPSON, S. G.; DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G. Measuring Inconsistency in meta-analyses. **BMJ Clinical research**. v. 327, n. 7414, p. 557–560, 2003.

HU, J.; WANG, J.; XIANG, H.; LI, Z.; WANG, B.; CAO, Y.; MA, X. Association of polymorphisms in the estrogen receptor beta (*ESR2*) with unexplained recurrent spontaneous abortion in Chinese population. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine**. v. 25, n. 9, p. 1727–1729, 2012.

ICHIKAWA, S.; KOLLER, D. L.; PEACOCK, M.; JOHNSON, M. L.; LAI, D.; SIU, L.; JOHNSTON, C. C. FOROUD, T. M. ECONS, M. J. Polymorphisms in the estrogen receptor beta (*ESR2*) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. v. 90, n. 11, p. 5921–5927, 2005.

JÄRVINEN, T. A. H.; PELTO-HUIKKO, M.; HOLLI, K.; ISOLA, J. estrogen receptor β is coexpressed with ER α and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. **American Journal of Pathology**. v. 156, n. 1, p. 29–35, 2000.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 29, n. 4, p. 557–568, 2015.

JOHN, R.; DHILLON, M. S.; SHARMA, S.; PRABHAKAR, S.; BHANDARI, M. Is There a Genetic Predisposition to Anterior Cruciate Ligament Tear? A Systematic Review. **American Journal of Sports Medicine**. v. 44, n. 12, p. 3262–3269, 2016.

JONES, G. C.; CORPS, A. N.; PENNINGTON, C. J.; CLARK, I. M.; EDWARDS, D. R.; BRADLEY, M. M.; HAZLEMAN, B. L.; RILEY, G. P. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. **Arthritis and Rheumatism**. v. 54, n. 3, p. 832–842, 2006.

JUREČEKOVÁ, J.; SIVOŇOVÁ, M. K.; EVINOVÁ, A.; KLIMENT, J.; DOBROTA, D. The association between estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of prostate cancer in Slovak population. **Molecular and cellular biochemistry**. v. 381, n. 1–2, p. 201–7, 2013.

KARASIK, D.; KIEL, D. P. Evidence for pleiotropic factors in genetics of the musculoskeletal system. **Bone**. v. 46, n. 5, p. 1226–1237, 2010.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; CHOI, I.; DELAGE-MOURROUX, R.; EDIGER, T. R.; MARTINI, P. G. V.; MONTANO, M.; SUN, J.; WEIS, K.; KATZENELLENBOGEN, J. A. molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and. **Journal of Steroid Biochemistry**. v. 74, p. 279–285, 2000.

KELLY, M. J.; LEVIN, E.R. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism**. v. 12, n. 4, p. 152–156, 2001.

KERKHOF, H. J. M.; MEULENBELT, I.; CARR, A.; GONZALEZ, A.; HART, D.; HOFMAN, A.; KLOPPENBURG, M.; LANE, N. E.; LOUGHLIN, J.; NEVITT, M. C. Common genetic variation in the Estrogen Receptor Beta (*ESR2*) gene and osteoarthritis: results of a meta-analysis. **BMC Medical Genetics**. v. 11, p. 164, 2010.

KHOSLA, S.; RIGGS, B. L. Pathophysiology of Age-Related Bone Loss and Osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics**. v. 34, n. 4, p. 1015–1030, 2005.

KOTWICKI, T.; JANUSZ, P.; ANDRUSIEWICZ, M.; CHMIELEWSKA, M.; KOTWICKA, M. Estrogen receptor 2 gene polymorphism in idiopathic scoliosis. **Spine**. v. 39, n. 26, p. E1599-607, 2014.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, n. 12, p. 5925–5930, 1996.

KUNG, A. W. C.; LAI, B. M. H.; NG, M. Y. M.; CHAN, V.; SHAM, P. C. T-1213C polymorphism of estrogen receptor beta is associated with low bone mineral density and osteoporotic fractures. **Bone**. v. 39, n. 5, p. 1097–1106, 2006.

LAU, J.; IOANNIDIS, J. P.; SCHMID, C. H. Summing up evidence: one answer is not always enough. **Lancet**. v. 351, n. 9096, p. 123–127, 1998.

LEE, C. A.; LEE-BARTHEL, A.; MARQUINO, L.; SANDOVAL, N.; MARCOTTE, G. R.; BAAR, K. Estrogen inhibits lysyl oxidase and decreases mechanical function in engineered ligaments. **Journal of Applied Physiology**. v. 118, n. 10, p. 1250–1257, 2015.

LEE, S. W.; SONG, J. H.; CHOI, W. S.; YOON, J. H.; KIM, O.; PARK, Y. G.; NAM, S. W.; LEE, J. Y.; PARK, W. S. The single nucleotide polymorphism (SNP) of the estrogen receptor- β gene, rs1256049, is associated with knee osteoarthritis in Korean population. **The Knee**. v. 21, n. 1, p. 242–6, 2014.

LEITMAN, D. C.; PARUTHIYL, S.; VIVAR, O. I.; SAUNIER, I. F.; HERBER, C. B.; COHEN, I.; TAGLIAFERRI, M.; SPEED, T. P. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 10, n. 6, p. 629–636, 2010.

LI, L-W.; XU, L. Menopausal Status Modifies Breast Cancer Risk Associated with *ESR1* *PvuII* and *XbaI* Polymorphisms in Asian Women: a HuGE Review and Meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 13, n. 10, p. 5105–5111, 2012.

LI, T. WU, QY., ZHANG, C.; LI, WW.; LI, N.; CUI, YX.; LI, XJ.; XIA, XY. Polymorphisms in estrogen receptors predict the risk of male infertility: a meta-analysis. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.12, n.79, p. 1-13, 2014.

LIEBERMAN, B. A. The Estrogen Receptor Activity Cycle: Dependence on Multiple Protein-Protein Interactions. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**. v. 7, n. 1–2, p. 43–59, 1997.

LIU, STEPHEN; AL-SHAikh, RAAD; PANOSSIAN, VAHE; FINERMAN, GERALD; LANE, J. Affects the Cellular Metabolism of the Anterior Cruciate Ligament Estrogen Explanation Injury *. **The American journal of sports medicine**. v. 25, n. 5, p. 704–709, 1997.

LIU, W.; SHAO, F-M.; YAN, L.; CAO, H-X.; QIU, D. Polymorphisms in the gene encoding estrogen receptor alpha are associated with osteoarthritis in Han Chinese women. **International journal of clinical and experimental medicine**. v. 7, n. 12, p. 5772–7, 2014.

LONGO, U.; LOPPINI, M.; MARGIOTTI, K.; SALVATORE, G.; BERTON, A.; KHAN, W. S.; MAFFULLI, N.; DENARO, V. Unravelling the Genetic Susceptibility to Develop Ligament and Tendon Injuries. **Current Stem Cell Research & Therapy**. v. 10, n. 1, p. 56–63, 2014.

LU, T.; ACHARI, Y.; RATTNER, J. B.; HART, D. A. Evidence that estrogen receptor beta enhances MMP-13 promoter activity in HIG-82 cells and that this enhancement can be influenced by ligands and involves specific promoter sites. **Biochem Cell Biol**. v. 85, n. 3, p. 326–336, 2007.

LUCONI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 80, n. 4–5, p. 369–381, 2002.

MAFFULLI, N.; VIA, A. G.; OLIVA, F. Chronic Achilles Tendon Disorders: Tendinopathy and Chronic Rupture. **Clinics in Sports Medicine**. v. 34, n. 4, p. 607–624, 2015.

MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Molecular Events in Tendinopathy: A Role for Metalloproteases. **Foot and Ankle Clinics**. v. 10, n. 2, p. 267–277, 2005.

MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Genetics: Does it play a role in tendinopathy? **Clinical Journal of Sport Medicine**. v. 17, n. 4, p. 231–233, 2007.

MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Genetic aspects of tendinopathy. **Journal of Science and Medicine in Sport**. v. 11, n. 3, p. 243–247, 2008.

MACKAY, T. F. The genetic architecture of quantitative traits. **Annu. Rev. Genet**. v. 35, p. 303–339, 2001.

MANN, R. A. Flatfoot in adults. In: Mann RA, Coughlin MJ editors. **Surgery of the foot and ankle**. St Louis: C. V. Mosby. v.33, p.302–9, 1993.

MANEY, D. L. Polymorphisms in sex steroid receptors: From gene sequence to behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 47, p. 47–65, 2017.

MANSUR, A. P.; NOGUEIRA, C. C. M.; STRUNZ, C. M. C.; ALDRIGHI, J. M.; RAMIRES, J. A. F. Genetic polymorphisms of estrogen receptors in patients with premature coronary artery disease. **Archives of medical research**. v. 36, n. 5, p. 511–7, 2005.

MARINO, M.; PELLEGRINI, M.; LA ROSA, P.; ACCONCIA, F. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. **Steroids**. v. 77, n. 10, p. 910–917, 2012.

MARKIEWICZ, M.; ZNOYKO, S.; STAWSKI, L.; GHATNEKAR, A.; GILKESON, G.; TROJANOWSKA, M. A role for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in collagen biosynthesis in mouse skin. **The Journal of investigative dermatology**. v. 133, n. 1, p. 120–127, 2013.

MARUYAMA, H.; TOJI, H.; HARRINGTON, C. R.; SASAKI, K.; IZUMI, Y.; OHNUMA, T.; ARAI, H.; YASUDA, M.; TANAKA, C.; EMSON, P. C.; NAKAMURA, S.; KAWAKAMI, S. Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. **Archives of Neurology**. v. 57, n. 2, p. 236–240, 2000.

MARYFRAN, R.; SOWERS, H. Z.; MCCONNELL, D.; NAN, B.; HARLOW, S.; RANDOLPH, J. F. Follicle Stimulating Hormone and Its Rate of Change in Defining Menopause Transition Stages. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 93, p. 3958–64, 2008.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J. A Subtle Balance ERalpha ERbeta. **Review Literature And Arts Of The Americas**. v. 3, n. 5, p. 281–292, 2003.

MAURANO, M. T.; HUMBERT, R.; RYNES, E.; THURMAN, R. E.; HAUGEN, E.; WANG, H.; et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. **Science**. n. 337, p. 1190–1195, 2012.

MCDONNELL, D. P.; NORRIS, J. D. Connection and Regulation of the Human Estrogen Receptor. **Science**. v. 296, p. 1642–1644, 2002.

MICHALOWICZ, B.S. et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71: 1699–1707.

MIN, J-A.; KIM, J. J.; PAE, C-U.; KIM, K. H.; LEE, C-U.; LEE, C.; PAIK, I. H. Association of estrogen receptor genes and schizophrenia: a preliminary study. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**. v. 36, n. 1, p. 1–4, 2012.

MOKONE, G. G.; SCHWELLNUS, M. P.; NOAKES, T. D.; COLLINS, M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in sports**. v. 16, n. 1, p. 19–26, 2006.

MONASTERO, R.; CEFALÙ, A. B.; CAMARDA, C.; NOTO, D.; CAMARDA, L. K.; CALDARELLA, R.; IMBORNONE, E.; AVERNA, M. R.; CAMARDA, R. Association of estrogen receptor alpha gene with Alzheimer's disease: a case-control study. **Journal of Alzheimer's disease**. v. 9, n. 3, p. 273–8, 2006.

MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M. M.; SIMPSON, E. R.; FISHER, C.; QIN, K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 80, n. 12, p. 3689–3698, 1995.

MORON, F. J. et al. Multilocus analysis of estrogen-related genes in Spanish postmenopausal women suggests an interactive role of *ESR1*, *ESR2* and *NR1P1* genes in the pathogenesis of osteoporosis. **Bone**. v. 39, n. 1, p. 213–221, 2006.

MOTTA, G.; MENDOZA, N.; VÁZQUEZ, F.; MOLERO, E.; QUEREDA, F.; SALINAS, A.; FONTES, J.; MARTÍNEZ-ASTORQUIZA, T.; SÁNCHEZ-BORREGO, R.; RUIZ, A. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**. v. 23, n. 2, p. 227–235, 2014.

MUN, M. J.; KIM, JH.; KIM, TH.; HWANG, JY.; JANG, WC. Associations between Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and Endometriosis. **J Korean Soc Menopause**. v. 19, p. 64–73, 2013.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, D.; ANSARI-POUR, N. The essentiality of reporting Hardy-Weinberg equilibrium calculations in population based genetic association studies. **Cell J**. v.17, n.2, p. 187-192, 2015.

NILSSON, M.; DAHLMAN, I.; JIAO, H.; GUSTAFSSON, J. A.; ARNER, P.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Impact of estrogen receptor gene polymorphisms and mRNA levels on obesity and lipolysis – a cohort study. **BMC Medical Genetics**. n. 8, p. 73, 2007.

NILSSON, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J.-Å. Nuclear receptors in disease: the oestrogen receptors. **Essays In Biochemistry**. v. 40, p. 157–167, 2004.

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema musculoesquelético**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

PANNI, A.; TRATARONE, M.; MAFFULLI, N. Patellar tendinopathy in athletes: outcome of nonoperative management. **Am J Sport Med**, v.28, n.3, p.392-397, 2000.

PAVAO, M.; TRAISH, A .M. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection localization and analyses of estrogen receptor α and β . **Steroids**. v.66, n.1, p.1-6, 2001.

PONTIN, P. A.; NOGARA, P. R. B.; FERNANDES, T. D.; FONSECA, F. C. P.; CESAR NETTO, C.; CARVALHO, K. C.; SOARES JUNIOR, J. M.; MAFFULLI, N.; SANTOS, M. C. L.; GODOY-SANTOS, A. L. ER α *PvuII* and *XbaI* polymorphisms in postmenopausal women with posterior tibial tendon dysfunction: a case control study. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. v. 13 p. 1–5, 2018.

POSTHUMUS, M.; SEPTEMBER, A. V.; SCHWELLNUSA, M. P.; COLLINS, M. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in

participants with Achilles tendon injuries and controls. **Journal of Science and Medicine in Sport**. v. 12, n. 1, p. 184–189, 2009.

POSTHUMUS, M.; SEPTEMBER, A.; SCHWELLNUS, M. P.; COLLINS, M. Identification of genetic risk factors underlying complex multifactorial phenotypes. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**. v. 18, n. 12, p. 1810–1811, 2010.

RA, H.-J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Journal of the International Society for Matrix Biology**. v. 26, n. 8, p. 587–96, 2007.

RALEIGH, S. M.; VAN DER MERWE, L.; RIBBANS, W. J.; SMITH, R. K. W.; SCHWELLNUS, M. P.; COLLINS, M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. **British Journal of Sports Medicine**. v. 43, n. 7, p. 514–520, 2009.

RAZANDI, M. ALTON, G.; PEDRAM, A.; GHONSHANI, S.; WEBB, P.; LEVIN, E. R. Identification of a Structural Determinant Necessary for the Localization and Function of Estrogen Receptor α at the Plasma Membrane. **Molecular and Cellular Biology**. v. 23, n. 5, p. 1633–1646, 2003.

REN, Y.; TAM, B.; YAN, P.; YOU, Y.; WU, Y.; WANG, Y. Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. **BMC musculoskeletal disorders**. v. 16, n. 1, p. 44, 2015.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology**. v. 43, n. 2, p. 131–142, 2004.

ROMAN-BLAS, J. A.; CASTAÑEDA, S.; LARGO, S.; HERRERO-BEAUMONT, G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. **Arthritis Research & Therapy**. v. 11, n. 5, p. 241–255.

SAFARINEJAD, M. R.; MOHAMMAD, R.; SAFARINEJAD, S. SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. Estrogen receptors alpha (rs2234693 and rs9340799), and beta (rs4986938 and rs1256049) genes polymorphism in prostate cancer: evidence for association with risk and histopathological tumor characteristics in Iranian men. **Molecular carcinogenesis**. v. 51 Suppl 1, p. E104–17, 2012.

SATOMI, E.; TEODORO, W. R.; PARRA, E. R.; FERNANDES, T. D.; VELOSA, A. P. P.; CAPELOZZI, V. L.; YOSHINARI, N. H. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen. **Clinics**. v.63, n.1, p.9–14, 2008.

SCHAPER, E.; ERIKSSON, A.; RAFAJLOVIC, M.; SAGITOV, S.; MEHLIG, B.; Linkage disequilibrium under recurrent bottlenecks. **Genetics**. v. 190, n. 1, p. 217–229, 2012.

SCHUIT, S. C. E.; JONG, F. H.; STOLK, L.; KOEK, W. N. H.; VAN MEURS, J. B. J.; SCHOOF, M. W. C. J.; ZILLIKENS, M. C.; HOFMAN, A.; VAN LEEUWEN, J. P. T. M.; POLS, H. A. P.; UITTERLINDEN, A. G. Estrogen receptor alpha gene

polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women. **European Journal of Endocrinology**. v. 153, p. 327–334, 2005.

SHEARMAN, A. M.; KARASIK, D.; GRUENTHAL, K. M.; DEMISSIE, S.; CUPPLES, L. A.; HOUSMAN, D. E.; KIEL, D. P. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. **Journal of bone and mineral research**. v. 19, n. 5, p. 773–781, 2004.

SHEN, C.; CHEN, J.; FAN, S.; LI, Z.; HU, Y.; ZHONG, Q. Association between the polymorphism of estrogen receptor α and coronary artery disease in a Chinese population. **European journal of internal medicine**. v. 23, n. 2, p. 175–8, 2012.

SHEN, C.; CHEN, Z.; MAHMOODURRAHMAN, M.; CHEN, X. Single nucleotide polymorphisms of ER beta and coronary atherosclerotic disease in Chinese Han women. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v. 8, n. 2, p. 2044–2050, 2015.

SHIN, A.; KANG, D.; NISHIO, H.; LEE, M. J.; PARK, S. K.; KIM, S-U.; NOH, D-Y.; CHOE, K-J.; AHN, S-H.; HIRVONEN, A.; KIM, J. H.; YOO, K. Y.; Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 80, n. 1, p. 127–131, 2003.

SHOUKRY, A.; SHALABY, S. M.; ETEWA, R. L.; AHMED, H. S.; ABDELRAHMAN, H. M. Association of estrogen receptor β and estrogen-related receptor α gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. **Molecular and Cellular Biochemistry**., v. 405, n. 1–2, p. 23–31, 2015.

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; SEEHRA, G. P. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. **J Biomech**.v.36, p.1529-1553, 2003.

SILVESTRI, S.; THOMSEN, A. B.; GOZZINI, A.; BAGGER, Y.; CHRISTIANSEN, C.; BRANDI, M. L. Estrogen receptor alpha and beta polymorphisms: is there an association with bone mineral density, plasma lipids, and response to postmenopausal hormone therapy? **Menopause**. v. 13, n. 3, p. 451–61, 2006.

SIMMONDS, R. J. **Chemistry of biomolecules: an introduction**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1992.

SIMONCINI, T.; GENAZZANI, A. R. Non-genomic actions of sex steroid hormones. **European journal of endocrinology**. v. 148, n. 3, p. 281–92, 2003.

SNEDEKER, J. G.; FOOLEN, J. Tendon injury and repair – A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. **Acta Biomaterialia**. v. 63, p. 18–36, 2017.

STAVROU, I.; ZOIS, I. C.; CHATZIKYRIAKIDOU, A.; GEORGIU, I.; TSATSOULIS, A. Combined estrogen receptor α and estrogen receptor β genotypes influence the age of menarche. **Human Reproduction**. v. 21, n. 2, p. 554–557, 2006.

SUBA, Z. Amplified Crosstalk Between Estrogen Binding and GFR Signaling

Mediated Pathways of ER Activation Drives Responses in Tumors Treated with Endocrine Disruptors. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**. v. 13, p. 428-444.

TEERLINK, C. C.; CANNON-ALBRIGHT, L. A.; TASHJIAN, R. Z. Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor- β (ESRRB). **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**. v. 24, n. 2, p. e31–e35, 2015.

TORRICELLI, P.; VERONESI, F.; PAGANI, S.; MAFFULLI, N.; MASIERO, S.; FRIZZIERO, A.; FINI, M. In vitro tenocyte metabolism in aging and oestrogen deficiency. **Age**. v. 35, n. 6, p. 2125–2136, 2013.

TREVILATTO, P. C.; LINE, S. R. Use of buccal epithelial cells for pcr amplification of large DNA fragments. **J Forensic Odontostomatol**. v.18, p.6-9, 2000.

USHIYAMA, T.; UEYAMA, H.; INOUE, K.; NISHIOKA, J.; OHKUBO, I.; HUKUDA, S. Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. **The Journal of rheumatology**. v. 25, n. 1, p. 134–7, 1998.

VASTA, S.; DI MARTINO, A.; ZAMPOGNA, B.; TORRE, d.; PAPALIA, R.; DENARO, V. Role of VEGF, nitric oxide, and sympathetic neurotransmitters in the pathogenesis of tendinopathy: A review of the current evidences. **Frontiers in Aging Neuroscience**. v. 8, n. AUG, p. 1–11, 2016.

VAUGHN, N. H.; STEPANYAN, H.; GALLO, R.A.; DHAWAN, A. Genetic Factors in Tendon Injury: A Systematic Review of the Literature. *Orthop J Sports Med*. 2017;5 Suppl 8:2325967117724416

WALL, J. D.; PRITCHARD, J. K. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**. v. 4, n. 8, p. 587–597, 2003.

WANG, M.; TAKAHASHI, A.; LIU, F.; YE, D.; DING, Q.; QIN, C.; YIN, C.; ZHANG, Z.; MATSUDA, K.; KUBO, M.; et al. Large-scale association analysis in Asians identifies new susceptibility loci for prostate cancer. **Nature Communications**. v. 6, 2015.

WEI, C.; ZHENG, HY.; WU, W.; DAI, W.; TONG, YQ.; WANG, M.; LI, W. Meta-Analysis of the Association of the Rs2234693 and Rs9340799 Polymorphisms of Estrogen Receptor Alpha Gene with Coronary Heart Disease Risk in Chinese Han Population. **Int. J. Med. Sci**. v. 10, 2013.

WEICKERT, C. S.; MIRANDA-ANGULO, A. L.; WONG, J.; PERLMAN, W. R.; WARD, S. E.; RADHAKRISHNA, V.; STRAUB, R. E.; WEINBERGER, D. R.; KLEINMAN, J.E. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia. **Human molecular genetics**. v. 17, n. 15, p. 2293–309, 2008.

WEIDERPASS, E.; PERSSON, I.; MELHUS, H.; WEDRÉN, S.; KINDMARK, A.; BARON, J. A. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 4, p. 623–7, 2000.

XIE, J.; WANG, S.; HE, B.; PAN, Y.; LI, Y.; ZENG, Q.; JIANG, H.; CHEN, J. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. **Fertility and sterility**. v. 92, n. 1, p. 54–60, 2009.

XU, H.; HOU, X.; WANG, N.; HUI, B.; JIN, J.; YUN, S.; WANG, X.; HE, X.; HE, J.; ZHANG, S.; HAN, Y. Gender-specific effect of estrogen receptor-1 gene polymorphisms in coronary artery disease and its angiographic severity in Chinese population. **International journal of clinical chemistry**. v. 395, n. 1–2, p. 130–3, 2008.

XU, Y.; MURREL, G. A. C. The basic science of tendinopathy. **Clin Orthop Relat Res**. v.446, p.1528-1538, 2008.

YAŞAR, P.; AYAZ, G.; USER, S. D.; GÜPÜR, G.; MUYAN, M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. **Reproductive Medicine and Biology**. v. 16, n. 1, p. 4–20, 2017.

YE, S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. **Matrix Biol**. v.19, p.629-39, 2000

YIN, Y.-W.; SUN, Q.-Q.; HU, A.-M.; WANG, Q.; LIU, H.-L. Association of rs9340799 polymorphism in estrogen receptor alpha gene with the risk of osteoarthritis: evidence based on 8,792 subjects. **Molecular genetics and genomics**. v. 290, n. 2, p. 513–20, 2015.

YU, L.; WANG, C.-Y.; SHI, J.; MIAO, L.; DU, X.; MAYER, D.; ZHANG, J. Estrogens promote invasion of prostate cancer cells in a paracrine manner through up-regulation of matrix metalloproteinase 2 in prostatic stromal cells. **Endocrinology**. v. 152, n. 3, p. 773–781, 2011.

YU, W. D.; PANOSSIAN, V.; HATCH, J. D.; LIU, S. H.; FINERMAN, G. A. Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior cruciate ligament. **Clin Orthop Relat Res**. v.383, p.268-81, 2001.

ZHAO, N.; HAO, F.; QU, T.; ZUO, Y.-G.; WANG, B.-X. A novel mutation of the WRN gene in a Chinese patient with Werner syndrome. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 33, n. 3, p. 278–281, 2008.

ZHAO, T.; ZHANG, D.; LIU, Y.; ZHOU, D.; CHEN, Z.; YANG, Y.; LI, S.; YU, L.; ZHANG, Z.; FENG, G.; HE, L.; XU, H. Association between *ESR1* and *ESR2* gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women. **Journal of human genetics**. v. 55, n. 1, p. 50–54, 2010.

ZHOU, X.; GU, Y.; WANG, D. N.; NI, S.; YAN, J. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. **PloS one**. v. 8, n. 4, p. e60851, 2013.

ZOFKOVA, I. Hormonal aspects of the muscle-bone unit. **Physiological research**. v.

57 Suppl 1, p. S159-69, 2008.

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA (RE1) E BETA (RE2) NA FISIOPATOGENIA DA INSUFICIÊNCIA DO TENDÃO TIBIAL POSTERIOR NO GÊNERO FEMININO

Pesquisador Responsável: Alexandre Leme Godoy dos Santos

Versão: 1

Pesquisador Executante: Pedro Augusto Pontin

CAAE: 11210213.2.0000.0068

Co-autores: Tulio Diniz Fernandes, Edmund Chada Baracat, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos.

Instituição: HCFMUSP

Departamento: ORTOPEdia E TRAUMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10166

Número do Parecer: 268.419

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto: A proposta do estudo "Análise do polimorfismo dos receptores de estrógeno alfa (RE1) e beta (RE2) na fisiopatogenia da insuficiência do tendão tibial posterior no gênero feminino" está bem justificada na introdução, os objetivos são claros e a casuística calculada para responder adequadamente a pergunta do trabalho.

Objetivo da Pesquisa: Investigar a associação de polimorfismos dos genes promotores dos receptores de estrógeno alfa (RE1) e beta (RE2) e a tendinopatia primária do tibial posterior em mulheres, durante o período perimenopausal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há benefícios diretos ao paciente, tendo em vista tratar-se de uma hipótese de que a alteração genética possa estar relacionada na fisiopatogenia da insuficiência do tendão tibial posterior no gênero feminino. Entretanto, julgamos haver benefício indireto aos pacientes, caso exista relação que explique a fisiopatogenia da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo está claramente justificado e desenhado e utilizará metodologia genética clássica aplicada em material (saliva) com coleta pouco invasiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequar cronograma de realização, pois consta início de coleta de amostras sem aprovação prévia do comitê de ética.

Recomendações: Adequar cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Há pendências a serem observadas pelo pesquisador

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 10 de Maio de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed

Create RSS Create alert Advanced Help

Format: Abstract

Send to

Full text links

Read free full text at **PMC** **Full text**

Save items

Similar articles

Posterior tibial tendinopathy associated with matrix metalloproteinase 13 *Int J Gene Med.* 2016]

MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tend *[Gene.* 2014]

Association of PvuII and XbaI polymorphisms on estrogen receptor alpha (ESR1) *[PLoS One.* 2017]

Review Association between polymorphisms in the estrogen r *[BMC Musculoskelet Disord.* 2015]

Review Association between Estrogen Receptor-α Gene XbaI and P *[Dis Markers.* 2015]

See reviews... See all...

Related information

Gene

Gene (GeneRIF)

Gene (nucleotide/PMC)

MedGen

J Orthop Surg Res. 2018 Dec 11;13(1):316. doi: 10.1186/s13018-018-1020-x.

ERα PvuII and XbaI polymorphisms in postmenopausal women with posterior tibial tendon dysfunction: a case control study.

Pontin PA¹, Nogueira PRB², Fonseca FCP¹, Cesar Netto C³, Carvalho KC⁴, Soares Junior JM⁴, Barakat EC⁴, Fernandes TD¹, Maffulli N^{5,6,7}, Santos MCL², Godoy-Santos AL¹.

Author information

Abstract

BACKGROUND: Posterior tibial tendon (PTT) insufficiency is considered as the main cause of adult acquired flat foot and is three times more frequent in females. High estrogen levels exert a positive effect on the overall collagen synthesis in tendons. We have previously demonstrated the association between some genetic single-nucleotide polymorphism (SNP) and tendinopathy. In the present study, we investigated the association of PvuII c454-397T>C (NCBI ID: rs2234693) and XbaI c454-351A>G (NCBI ID: rs9340799) SNPs in estrogen receptor alpha (ER-α) gene with PPT dysfunction.

METHODS: A total of 92 female subjects with PTT dysfunction, with histopathological examination of the tendon and magnetic resonance image (MRI) evidence of tendinopathy, were compared to 92 asymptomatic females who presented an intact PPT at MRI for PvuII and XbaI SNPs in the ER-α gene. Genomic DNA was extracted from saliva and genotypes were obtained by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism.

RESULTS: The analysis of PvuII SNPs showed no significant differences in the frequency of alleles and genotypes between control and PTT dysfunction groups. The XbaI SNPs in the ER-α gene showed significant differences in the frequency of genotypes between control and test groups ($p = 0.01$; OR 95% 1.14 (0.55-2.33)).

CONCLUSIONS: The XbaI SNP in the ERα gene may contribute to tendinopathy, and the A/A genotype could be a risk factor for PTT tendinopathy in this population. The PvuII SNP studied was not associated with PTT tendinopathy.

KEYWORDS: Estrogen receptor; Genetic polymorphism; Risk factor; Tendinopathy

PMID: 30537990 PMCID: [PMC6280490](#) DOI: [10.1186/s13018-018-1020-x](#)

[Indexed for MEDLINE] [Free PMC Article](#)



ANEXO 3 – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Association of estrogen receptor β *AluI* and *RsaI* polymorphisms with posterior tibial tendon dysfunction

Nogara PRB¹, Godoy-Santos AL², Fonseca FCP², Cesar Netto C³, Carvalho KC⁴, Baracat EC⁴, Maffulli N^{5, 6, 7}, Pontin PA², Santos MCL¹

¹*Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Curitiba, PR, Brazil*

²*Department of Orthopaedics, Foot and Ankle Service, Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.*

³*Department of Orthopedic, Medstar Union Memorial Hospital, Baltimore, USA*

⁴*Department of Gynecology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.*

⁵*Centre for Sports and Exercise Medicine Barts and The London School of Medicine and Dentistry, London, United Kingdom.*

⁶*Department of Musculoskeletal Surgery, University of Salerno School of Medicine, Surgery and Dentistry, Salerno, Italy*

⁷*Institute of Science and Technology in Medicine, Keele University School of Medicine, Stoke on Trent, UK*

Abstract

Posterior tibial tendon (PTT) is three times more common in females, and some patients may have a predisposition without a clinically evident cause, suggesting that individual characteristics play an important role in tendinopathy. The present study investigated the association of *AluI* (rs4986938 +1730G > A) and *RsaI* (rs1256049 1425 G > A) single nucleotide polymorphisms (SNPs) of estrogen receptor-beta (ER- β) gene with PPT dysfunction. A total of 400 participants were recruited. The PTT dysfunction group: these patients underwent surgery, with PTT tendinopathy confirmed by histopathology and magnetic resonance image (MRI). The control group was composed of participants with no clinical or MRI evidence of PTT dysfunction. Each group was composed of 100 postmenopausal women, 50 premenopausal women, and 50 men. Genomic DNA was extracted from saliva samples, and genotypes were obtained by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Concerning the ER- β *AluI* SNP, there were significant differences in the frequencies of alleles between test and control groups of postmenopausal women and men ($p=0.0016$ and $p=0.0001$). Considering the PTT dysfunction group and comparing postmenopausal women versus premenopausal women

adding men, the analysis showed significant differences in the allelic distribution ($p=0.0450$): the allele A in postmenopausal women is a risk factor. The ER- β *RsaI* SNP did not show differences in the frequencies of alleles and genotypes between groups. The ER- β *AluI* SNPs, but not ER - β *RsaI* SNPs, is associated with PTT insufficiency in the Brazilian population, with additional risk in postmenopausal women.

Keywords: Tendinopathy; Estrogen Receptor; Genetic polymorphism; Risk factor.

ANEXO 4 – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Genetic polymorphisms in the *ESR2* gene and its association with increased risk of musculoskeletal disorders: a systematic review and meta-analysis

Paula Regina Bach Nogara^{1,2}, Francielle Boçon de Araújo Munhoz¹, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos¹

¹ *Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná – UFPR, Curitiba - PR, Brazil.*

² *Molecular Biology Laboratory, Integrated Colleges Valley of the Iguaçu – UNIGUAÇU, União da Vitória – PR, Brazil.*

Abstract

Estrogen plays a key role in the development and integrity of the female and male musculoskeletal system. Polymorphisms in genes encoding the receptor for estrogen have been studied as risk factors for these diseases. These systematic review and meta-analysis evaluated the possible interaction between polymorphisms in *ESR2* gene with musculoskeletal disorders. Data sources were obtained of PubMed (Medline), Web of Science and Scopus databases and six were selected for this meta-analysis, totalizing 2.199 participants (1.367 cases and 832 controls). The dominant (AA + AG vs GG) and recessive models (GG + AG vs AA) were applied. Based on the results of our meta-analysis, recessive genotype AA (RR 0.55, 95% CI 0.42 – 0.73, $P < 0.0001$) and allele recessive A (RR 1.87, 95% CI 1.32 – 2.65, $P = 0.0005$) of *AluI* polymorphism could be considered an important polymorphism. This association was found in North Africans women who had low bone mineral density. No association were identified to genotype recessive and dominant of *RsaI* polymorphism, but recessive allele A in Asian women can confer risk (RR 1.45, 95% CI 1.10 – 1.92, $P = 0.0085$). Studies with larger populations would be needed to better assess the risk of these polymorphisms with musculoskeletal disorders.

Keywords: Biomarkers, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Estrogen Receptor, Skeletal Muscle Pathology.